

A HÍDI *FORMATIO RETICULARIS* AKTIVÁLÓ HATÁSÁNAK SZEREPE A TUDATOS ÁLLAPOT FENNTARTÁSÁBAN

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS NEUROBIOLÓGIA DOKTORI PROGRAM

A Doktori iskola vezetője: Dr. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Sass Miklós

Témavezető: Dr. Juhász Gábor

Konzulens: Dr. Czurkó András

BaracsKay Péter

Proteomikai Laboratórium

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK

ÁBRÁK JEGYZÉKE	4
TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	6
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
1. BEVEZETÉS	1
1.1. ELŐSZÓ.....	1
1.2. MEGJEGYZÉSEK	4
1.3 AZ AGYTÖRZS SZEREPE A TUDATOSSÁG FENNTARTÁSÁBAN	8
1.3.1 „Centrencephalikus” integráló rendszer	8
1.3.2 Felszálló aktiváló rendszer (ARAS).....	13
1.4 AZ ARAS ANATÓMIÁJA ÉS FIZIOLÓGIÁJA.....	30
1.4.1 A <i>formatio reticularis</i> állományának elhelyezkedése az agytörzs szürkeállományában.....	30
1.4.2 Az ARAS sejtjeinek morfológiája és fiziológiája	36
1.4.3. Az ARAS magjaiban levő óriás sejttestű neuronok feltehetőleg szelektíven sérülnek a fokális epilepszia generalizációjakor.....	50
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	51
3. KÉRDÉSFELVETÉS	53
4. METODIKA.....	55
4.1 Állataink.....	55
4.2 A 4-aminopiridin (4-AP) kristály fokális-kortikális felhelyezése	55
4.3 4-AP, pilokarpin és kainát szisztémás beadásai	56
4.4 Szisztémás kainát kezelés, mint második beadás 4-AP és/vagy pilokarpin után	56
4.5 A Racine-féle magatartási skálázás	56
4.6 Az SE EEG követése.....	56
4.7 Perfúzió és metszés	57
4.8 Gallyas-féle sötét sejt ezüstözés	57
4.9 Egy szilícium (Si) alapú, speciális mikroelektród tervezése és kivitelezése	58
4.10 A nyomtatott áramkör alapú (PCB) flexibilis kábel kialakítása, elkészítése	58
4.11 A mikromozgató.....	60
4.12 Az elektród beültetése és az elvezetések kialakítása	60
4.13 Az elvezetések pontos helyének szövettani meghatározása	62
4.14 Állataink motilitásának monitorozása a kísérletek folyamán.....	63
4.13 Auditoros (AEP), vizuális (VEP) kiváltott válaszok és a megrezzenési reakciók elvezetése és kiváltása.....	63
4.14 Tetrodotoxin (TTX) mikrodialitikus beadása szabadon mozgó állatokba	64
4.15 Az extracelluláris akciós potenciálok (eAP), az EcoG és a kiváltott válaszok elvezetése	65
4.16 Normalizált keresztkorrelációs (CCG) módszer ('spike' helyettesítési eljárás) ...	65
4.17 A monoszintaptikus sejt párok effektív konnektivitásának (EC) állapotfüggő és dinamikus megváltozása	67
4.18 Állataink fiziológiai monitorozása az fMRI felvételek alatt	68
4.19 Az FC fMRI képalkotás és a PnO stimuláció.....	69

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK	72
5.1 A status epilepticus alatt szelektíven sérül a gigantocelluláris rendszer	72
5.2 Vajon az SE kései fázisában létrejövő lassú hullámú periodikus epileptiform kisülések a hídi óriás sejtek funkcionális hanyatlásának következményei?	77
5.3 Szabadon mozgó állatok PnO-jában levő óriás sejtek aktivitása 'arousal' függő..	79
5.4 Az óriás sejtek és az interneuronok közti szinaptikus kapcsolat dinamikusan változó az alvás-ébrenléti ciklus alatt.....	89
5.5 A PnO lokális paralízise komatikus állapothoz vezet	96
5.6 A PnO magas frekvenciás stimulációjának hatására megnövekedik a funkcionális konnektivitás (FC) a frontális és paralimbikus kérgekben	103
6. ÁLTALÁNOS KÖVETKEZTETÉSEK	109
7. KORLÁTOK ÉS KITEKINTÉS	118
HIVATKOZÁSOK	122
ÖSSZEFOGLALÁS	142
SUMMARY	143
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	144

ÁBRÁK JEGYZÉKE

- 1.1 ábra A centrecephalikus integráló rendszer kialakulásának stádiumai
- 1.2 ábra A 'hálózati inhibíciós hipotézis' a komplex-parciális rohamok alatt fellépő eszméletvesztést magyarázza
- 1.3 ábra Frederic Bremer agytörzsi átmetszéseinak hatásai.
- 1.4 ábra A felszálló aktiváló rendszer (ARAS).
- 1.5 ábra A rostrális hídi- (B) és a kaudális hídi átmetszés (pretrigeminális) (B) a macska agytörzsének horizontális metszetén és ezek hatásai a frontális kérgi EEG-re.
- 1.6 ábra Mikrostimulációs kísérletek melyek bizonyítják, hogy a PnO az ARAS fő komponense
- 1.7 ábra Aktiváló és szinkronizáló központok a hídi tegmentumban
- 1.8 ábra Sematikus áttekintő ábra az alvás létrejöttében szerepet játszó NREM (kék, Slow-wave sleep, SWS) és REM (zöld, Paradoxical sleep, PS), valamint az ébresztő (telt piros: az EEG-re ható, üres piros: a viselkedési 'arousal' válaszra ható) neurotranszmitter rendszerekről és hatásaikról (jobbra fent és balra lent)
- 1.9 ábra Nyolc kómas agyában levő léziók egymást átfedő területei.
- 1.10 ábra Az ARAS (klasszikus retikuláris magok) elhelyezkedése (piros) az agytörzs heterogén szürkeállományában
- 1.11 ábra A *formatio reticularis* "hálózatos" sejtjei
- 1.12 ábra A PnO/PnC neuronjainak három csoportja a belső tüzelési sajátosságaik alapján (D). Közülük az LTBN neuronok rendelkeznek óriás glutamáterg sejttesttel (A, B és C)
- 1.13 ábra Az óriás sejtek membránpotenciáljának és akcióspotenciáljainak változásai az alvás-ébrenléti ciklus alatt.
- 1.14 ábra Különböző neurotranszmitterek hatásai a vPnO neuronokra *in vitro*.
- 1.15 ábra A vPnO sejtek tüzelési sajátosságai *in vivo*.
- 1.16 ábra A GABA-erg sejtek tüzelési jellemzői *in vitro*
- 1.17 ábra A GABA-erg idegsejtek elterjedése az ARAS magjaiban
- 1.18 ábra A PnC sejtek auditoros ingerre adott válasza *in vivo* intracelluláris elvezetésben
- 1.19 ábra Immobilizált állat Gi sejtjeinek multimodális szenzoros válaszai.

- 1.20 ábra A fejbefogott macskák különböző struktúráiból elvezetett egysejtaktivitások (A) és a PnO/PnC határról szabadonmozgó macskákból történt elvezetések rátaváltozásai az alvás-ébrenléti ciklus alatt
- 1.22 ábra A PnO-ban és a PnC-ben levő óriás sejtek (a, b, f, g és h) a *status epilepticus* lassú-hullámú aktivitással jellemezhető, generalizált szakaszában jelentek meg (i és f)
- 4.1 ábra A Si-elektrod/flexibilis –PCB kábel/mikromozgató rendszer
- 4.2 ábra A korona kialakítása és a szövettani analízis
- 4.3 ábra Az FC fMRI és a PnO stimuláció összehangolása
- 5.1 ábra Óriás ‘sötét’ sejtek a PnO-ban (A és B) és a PnC-ben (C és D) 4-AP-kristály fokális kortikális applikációja (A és C) és pilokarpin i.p. beadása (B és D) után
- 5.2 ábra ‘Sötét’ sejtek a Gi-ben a különféleképp indukált SE végső stádiumában (A, B és C) és a hídi ARAS magokban (PnO és PnC) (D és E) toleranciás prekondíció (4-AP) ellenére kialakuló KA-indukált SE-ban (F és G).
- 5.3 ábra Negatív kontroll (A) és ‘sötét’ óriás idegsejtek a rosztrális PnO-ból (B) PILO hatására. Reprezentatív EEG szakaszok (C) és ezek 1 órájának teljesítményspektruma (D) a generalizált konvulzív SE alatt PILO és KA hatására
- 5.4 ábra AZ ARAS magjaiból elvezetett feltehetően principális-jellegű idegsejtek eAP-jainak forma szerinti kategorizálása
- 5.5 ábra A vizsgált javasolt sejtípusok aktivitása (ráta átlag \pm SEM) az alvás-ébrenléti ciklus alatt
- 5.6 ábra A DpMe és a PnO principális és óriás sejtjeinek ráta változása a SWS/W váltás során szimultán elvezetésekben
- 5.7 ábra A rövid távú ‘spike’ átviteli hatékonyság (mono szinaptikus kapcsolat erősség) megváltozása az alvás- ébrenléti ciklus alatt
- 5.8 ábra Monoszinaptikusan kapcsolt sejt tripllett kapcsolatainak állapotfüggő (SWS, REM és W) változása egy alvás mikrociklusban
- 5.9 ábra A sejt párok kapcsolatának effektív konnektivitása (EC) dinamikusan változó az alvás-ébrenléti ciklus alatt
- 5.10 ábra A TTX (1 μ M) dialízise folyamán az EEG tartományok aránya jellegzetesen megváltozik
- 5.11 ábra Reprezentatív Wavelet analízis három húsz másodperces ECoG szakaszból
- 5.12 ábra Az AEP-ok (A, C és E) és a VEP-ok (B és D) megváltozása a TTX dialízis alatt.
- 5.13 ábra A TTX okozta komatikus állapotban a megrezzenési reakciók nem kiválthatók.

5.14 ábra Anatómiai MRI képek szagittális (A) és axiális (B) síkokból a stimuláció előtt

5.15 ábra Reprezentatív felvételek egy állatból a FC megnövekedéséről a forrás voxelekhez képest (NBM) a PnO stimulációjának hatására

5.16 ábra Átlagolt funkcionális (FC fMRI) aktivációs térképek a PnO stimulációja után.

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1.Táblázat: A fokális kortikális és a szisztémás epilepszia modellek összehasonlítása 3 órás túlélésnél

2.Táblázat: Az elvezetett eAP-ok és típusaik megoszlása az ARAS magokban

3.Táblázat: A szimultán elvezetett sejtek és keresztkorrelációik által talált monoszinaptikus kapcsolatok megoszlása

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3D: 3 dimenziós

4-AP: K⁺- csatorna blokkoló 4-aminopiridin

AC: Anterior Cinguláris Cortex

AEP: Auditoros kiváltott válasz (Auditory Evoked Potential)

AFNI: 'Analysis of Functional NeuroImages

AP: akciós potenciál

ARAS: Ascending Reticular Activating System

AW: aktív ébrenlét

BF: bazális előagy (Basal Forebrain)

BOLD: vér-oxigén-szint (Blood-Oxygen-Level Dependent)

CBF: Agyi vér átfolyás (Cerebral Blood Flow)

CCG: Normalizált keresztkorreláció (Cross Correlograms)

CnF: Nucleus Cuneiforme

CU: Nucleus Cuneatus

CS: kapcsoltság ereje (Connection Strength)

DBS: mély agyi stimuláció (Deep Brain Stimulation)

DNR: dorzális Raphe mag (Nuclei Raphe Dorsalis)

DpME: középagyi formatio reticularis (Deep Mesencephalic Nucleus)

eAP: extracelluláris akciós potenciál

EC: effektív konnektivitás (FC fMRI)

EC: két sejt effektív kapcsoltsága (Effective Connectivity)

EcoG: Elektrokortikogram

EEG: elektroencefalográfia

EPI: Echo Planar Imaging

FC: funkcionális konnektivitás (Functional Connectivity)

fMRI: funkcionális mágneses rezonancia képalkotás (Functional Magnetic Resonance Imaging)

fMRIB: Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain

FLIRT: Linear Image Registration Tool

FTG: óriássejtes tegmentális mező (Pontine Tegmental Field)

GABA: γ -amino-vajsav (γ -aminobutyric acid)

GAD1: GAD67 génje
GAD67: glutamát-dekarboxiláz egyik izoformája
GFP: fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
Gi: nyúltvelői gigantocelluláris mező (Nucleus Reticularis Gigantocellularis)
GR: Nucleus Gracilis
GTCS: Generalized Tonic-Clonic Seizure
HTBN: magas-küszöbű sorozattüzelő neuron (High-Threshold Bursting Neuron)
ICI: roham alatti tudatos tartalmi leltár (Ictal Consciousness Inventory)
ILN: thalamus intralamináris magja (Intralaminar Thalamic Nuclei)
IRt: Zona Reticularis Intermedialis
ISI: interspike-intervallum
JPSTH: Joint Peristimulus Time Histogram
KA: kainát
Ka: kálium
LC: Locus Coeruleus
LDT: Nucleus Laterodorsalis
LDTg: Nucleus Laterodorsalis Tegmentalis (LDTg)
LFP: Local Field Potential
LTBN: Low-Threshold Burst Neuron
LTP: Long-Term Potentiation
MAO%: Minimum Alveoláris Koncentráció
MCS: minimális tudati állapotban (Minimally Conscious State)
Mftg: mediális óriássejtes tegmentális mező
MNB: Meynert-féle mag (Nucleus Basalis of Meynert)
MNR: mediális Raphe mag (Nuclei Raphe Medialis)
MP: membrán-potenciál
MPGC: középagy GABA-erg kolumna
mPRF: mediális hídi formatio reticularis (Medial Pontine Reticular Formation)
MPTA: középagy-tegmentális anesztézia área (Mesopontine Tegmental Anesthesia Area)
MRF: középagy formatio reticulatis
MUA: Multi Unit Activity
NBM: Nucleus Basalis Meynerti
NBN: nem sorozattüzelő neuron (Non-Burst Neuron)

ND: Negatív Deflekció
NREM: gyors szemmozgással nem járó alvás (Non Rapid Eye Movement)
nRt: Nucleus Reticularis Thalami
PAG: centrális szürkeállomány
PBN: Nucleus Parabrachialis
PCA: Principal Component Analysis
PCB: nyomtatott áramkör
PD: Pozitív Deflekció
PFC: Prefrontális Cortex
pGi: Nucleus Reticularis Perigigantocellularis
PILO: pilokarpin
Pn: hídi magvak (Pontine Nuclei)
PnC: Nucleus Reticularis Pontis Caudalis
PnO: Nucleus Reticularis Pontis Oralis
PPtg: Nucleus Pedunculopontinus Tegmentalis
PPTg-pc: Nucleus Pedunculopontinus Tegmentalis pars compacta
PPTg-pd: Nucleus Pedunculopontinus Tegmentalis (pars dissipatus)
Pt: platina
PTFE: politetrafluoretilén
PVS: tartós vegetatív állapot (Persistent Vegetative State)
RARE: Rapid Acquisition with Refocusing Echoes
REM: gyors szemmozgásos alvás (Rapid Eye Movement)
RN: vörös-mag (Nucleus Ruber)
SD: standard deviáció
SE: status epilepticus
SEM: standard hiba
Si: szilícium
SNC: Substantia Nigra Pars Compacta
SPECT: egy foton emissziós computer tomográfia (Single Photon Emission Computed Tomography)
STL: megrezzenési reakció (Startle- reaction)
SuBC: subcoeruleus
SWS: lassú-hullámú alvás (Slow-Wave Sleep)
TMN: Tuberomamilláris mag (Nucleus Tuberomamillaris)

TTX: Tetrodotoxin

VEP: Vizuális kiváltott válasz (Visual Evoked Potential)

vPAG: ventrális periaqueductális szürkeállomány (Substantia grisea periaqueductalis ventralis)

vPnO: ventrális PnO

VRN: Nuclei Reticularis Ventralis

VTa: Area Tegmentalis Ventralis

W: ébrenlét

1. BEVEZETÉS

“Magasabban fejlett és intact organizmus viselkedése elég bonyolult ahhoz, hogy adott prekonceptió olyan jelenségeknek adjon nyomatékot, amelyek a koncepció alapján elvárhatók és észrevétlenül maradjanak olyanok, amelyeket ugyanez a koncepció nem posztulál.”

(Grastyán Endre, 1973)

1.1. ELŐSZÓ

E dolgozat mottójául választott gondolat szerző szerint a kanti-antinómia (Kant, 1781) fiziológiai példázata. Ez az elbizonytalanító megállapítás óva inti az olvasót, hogy az ebben a dolgozatban szerző által meghozott tudományos következtetéseket szükségképpen igaznak vegye, minthogy az összes elvégzett kísérlet nemhogy „*intact*”, hanem túlnyomórészt szabadon mozgó állatokon történt. Ugyanakkor a szerzőt nemcsak a kísérleti paradigmáinak túlzott bonyolultsága miatt meghozható egyenlő érvényű, de egymásnak ellentmondó következtetések lehetősége inti mértékletességre, hanem - ahogy a mottóból ez is tükröződik - a fiziológiai ismeretszerzés gyakorlatában és elméletében jelenlevő szükségszerű intencionalitás és prekonceptió.

A bécsi-kör által lefektetett és a jelenleg elfogadott tudományos következtetési eljárás - a verifikálhatóság elve - kimondja, hogy egy kijelentés tudományos értéke azonos annak tapasztalati ellenőrizhetőségének meglétével. Továbbá, hogy érvényes természettudományos megállapításokhoz indukció útján juthatunk oly módon, hogy először ismerjük meg a tapasztalati tényeket (azaz mért adatokat), melyekből ezután fogalmazhatjuk meg a minden adatra igaz általános elveket. Folyamatosan, lépésről-lépésre kell leszűrjünk a tudományos törvényeket, hogy a legvégén jussunk el az általánosabb elvekig (Schlick, 1910).

A mindennapi laboratóriumi gyakorlatból szerzett saját élmények után a fenti követelmények nyomasztóan hatnak, mivel a szerző fiziológiai kutatásai nem

képesek megfelelni nekik. Talán felmentő lehet az a tény, hogy előfeltevéseiket, preconcepcióikat más fiziológusok sem tudják a laboratóriumok küszöbén kívül hagyni, ha másért nem mert mérő módszereik kiválasztása már eleve beállítódást, irányultságot feltételez és már előre hatni fog a levont következtetésekre.

A fiziológia történetét tanulmányozva megállapíthatjuk, hogy bizonyos törvények - sokszor a legeredetibbek - nem az adatok pusztá felgyűlémlésével és ezekből levonható gondolatok fokozatos megfogalmazásával jöttek létre, hanem már előfeltevésként megszülettek anélkül, hogy tisztán kivonatolhatóak lettek volna az kísérleti eredményekből. Nagyszerű példa erre az ún. Hebb-típusú szinapszis esete (Hebb, 1949): Hebb anélkül mondta ki, hogy a tanulás alapja a neuronok közti facilitáció, hogy ismerte volna az évtizedekkel később kísérletileg ragyogóan igazolt hosszú-távú megerősítés (Long-Term Potentiation; LTP) fogalmát (Bliss és Lomo, 1973). A dolgozat leendő tárgyához közelítve is találhatunk hasonló példákat: Sherrington (Sherrington, 1906; Gerber és mtsai., 1989) létrehozta a centrális izgalmi és gátlási állapot fogalmát úgy, hogy csak a perifériás idegrendszert vizsgálta és nem tudhatta, hogy egyáltalán léteznek-e az idegrendszerben gátló interneuronok, melyeket csak jóval később írtak le a gerincvelőben (Lloyd, 1946; Eccles, 1957; Nunez és mtsai., 1998). Pavlov (Pavlov, 1928) csupán híres reflexkísérleteiből feltételezte, hogy az agykéregnek kell legyen egy ún. készenléti állapota, melyet „agykérgi tónus”-nak nevezett anélkül, hogy ismerhette volna az ún. agytörzsi felszálló aktiváló rendszer (Ascending Reticular Activating System; ARAS) létezését, mely felelős az agykéreg aspecifikus aktiválásáért (Moruzzi és Magoun, 1949). Ugyanakkor ezek - a saját idejünkben még igazolhatatlan feltevések - olyan termékenyen hatottak, hogy fiziológus kutatók tömegeit inspirálták kísérletezésre, melyek eredményei alapján, kiállták egy lényegében utólagos indukció próbáját. A fiziológia jellegében szintetizáló tudományág, és mint ilyen, kénytelen alkalmazni előfeltevéseket, melyek motiválják és beállítják a kísérleteket; így azt tudjuk mondani, hogy az indukció a fiziológiában sokszor csak követve igazolja a felfedezéseket, nem pedig elvezet hozzájuk. Természetesen egy adott

beállítódás nem tehet a kutatót vakká egyéb lehetséges megoldásokkal szemben, és minden előfeltevésnek ki kell állnia az utólagos indukció próbáját.

A fenti okfejtéssel a szerző csupán tisztázni szeretné, mielőtt belekezdene eredményei ismertetésébe, hogy nem tudta magát függetleníteni mesterei gondolati örökségétől, prekoncepcióitól és mérőműszereinek korlátozottságaitól. A dolgozatban bemutatásra kerülő munkánk célja az volt, hogy új eredményekkel járuljunk hozzá az ún. felszálló aktiváló rendszer (ARAS) sejtes működésének megértéséhez oly módon, hogy jellemzi az ARAS három kitüntetett régiójában elhelyezkedő idegsejt populációk tüzelési sajátosságait szabadonmozgó állatokban úgy, hogy párhuzamosan regisztráltunk belőlük egysejt aktivitásokat. Ezen neuronok tüzelési mintázatai könnyen összehasonlíthatók voltak egymással és az állatok éppen aktuális alvás-ébrenléti állapotaival, így egyszerre nyerhettünk adatokat az ARAS funkcionális belső szerveződéséről és arról, hogy aktivitásaik miképpen viszonyulnak az agykéreg aktivációs állapotaihoz. Előtanulmányainkból kiindulva ezután sikerült éber, szabadonmozgó állatokban paralizálni az agykéreg aktivációjában (*'arousal'*) leginkább résztvevő struktúrát bilaterálisan, amely felelős a szenzoros bemenetek és egyéb agytörzsi aktivációs hatások integrálásáért és közvetítéséért az agykéreg felé. Így alkalmunk nyílhatott megvizsgálni, hogy a regionális paralízis milyen hatásokkal bír a szabadonmozgó állatok agykérgi elektromos aktivitására és viselkedésére, miközben különböző módszerekkel monitoroztuk fiziológiai állapotukat. A fent ismertetett kísérletek számos információt szolgáltatottak arról, hogy milyen következményekkel jár az ARAS egy bizonyos részének funkcionális hanyatlása. Azonban ahhoz, hogy feltárható legyen milyen egyéb agyterületekre hat, avagy milyen agyterületeken keresztül fejt ki hatását az ARAS az agykéregre, fordított megközelítést kellett alkalmaznunk. Megvizsgáltuk azt, hogy az ARAS már említett részét magas frekvenciával ingerelve képesek vagyunk-e előidézni elektroenkefalográfiás (EEG) „*arousalt*” felületesen altatott állatokon és ezzel párhuzamosan a funkcionális konnektivitás (Functional Connectivity; FC) szintjén detektálható e növekedés a különböző agyterületek között a vér-oxigén-szint függő (Blood-Oxygen-Level Dependent; BOLD) funkcionális mágneses

rezonancia (functional Magnetic Resonance Imaging; fMRI) vizsgálat segítségével. Ez a kísérleti paradigma tehát a fent említett szelektív léziós kísérletek pozitív kontrolljának is tekinthető, mivel nem az aktiváló struktúra funkcionális kiesését követte nyomon, hanem működését mély agyi stimulációval kiváltva, valamint ezt az aktivált állapotot fMRI-BOLD technikával megvizsgálva láthatóvá tudtuk tenni, hogy mely agyi struktúrák között növekedett meg az FC, azaz mely agyi struktúrák között folyt funkcionális információ miközben szimultán regisztráltuk az EEG szintjén megjelenő 'arousalt'. Ez a kettős irányultság nem csak a kutatásokban volt jelen, hanem a dolgozatot is két különböző, de egymással tematikusan összefüggő egységre osztja. A két irányt az foglalja egységbe, hogy ugyanannak a szubkortikális neuronhálózatnak a hatásait vizsgálja az agykéreghez kötött tudatosság fenntartására, avagy elvesztésére.

A bevezető elején részben említett zseniális kísérletezők életműve nyomán az aktivációs paradigma sok-sok évtizede adott (Sherrington, 1906; Pavlov, 1928; Moruzzi és Magoun, 1949), ugyanakkor generális működésének pontos megismeréséhez még rengeteg kutatásra lesz szükség. A dolgozat alapját képező munka ebbe az irányba tesz tétova lépéseket úgy, hogy újabb adatokkal igyekszik hozzájárulni ahhoz, hogy megértsük, miképp szabályozza az ARAS a neokortex funkcionális állapotait.

1.2. MEGJEGYZÉSEK

A félreérthetőség és a zavarosság elkerülése érdekében már most tisztázni kell, hogy mit is értünk majd néhány olyan fogalmon, amelyek nem csupán a köznyelvben, hanem a pszichológiai és fiziológiai szaknyelvben is köznevesültek és számtalanszor előfordulnak majd a dolgozatban. Ezeket sokszor címkékként használjuk, holott jelentésük mögött sokszor igen eltérő és bonyolult pszichofiziológiai rendszerek működése húzódik meg.

A dolgozat alapját képező kísérletek nem titkolt célja, hogy adatokat szolgáltatassonak arról, hogy milyen szerepe van egy jól körülhatárolt szubkortikális neuronhálózatnak egy organizmus tudatának fenntartásában,

visszatérésében. A tudatos állapot neurális alapjainak megértése a mai idegtudomány egyik centrális kérdése (Crick és Koch, 2003). Fontos tehát tisztázni, hogy mit is értünk majd 'tudat' alatt. Egyik elterjedten használt definíció William James-től származik (James 1892), mely szerint a tudat „önmagad és a környezet érzete”. Nem állítjuk, hogy ez a megfogalmazás nem érvényes, de értelmezéséhez olyan újabb, bonyolult kognitív tartalmú kifejezések bevezetésére lenne szükség, mint például az én tudat („self”) vagy az érzet („perception”), melyek érezhetően csak következményei és nem feltételei a tudatosság („consciousness”) meglétének. Egy bonyolult fogalmat viszont nem illik még bonyolultabbakkal vagy szinonimákkal definiálni. Az ún. 'éntudat' fogalma például értelmezhetetlen az ember-félék családján kívül és nem foghatjuk fel másképp, minthogy önmagad és egyediséged *tudata*. Beláthatjuk tehát, hogy az ún. 'tudatosság' pszichológiai értelemben szubjektív és aktív folyamat, melynek rengeteg, egymástól el nem választható komponense van, melyek előfeltételei egyéb, magasabb mentális, kognitív folyamatoknak, mint például a figyelem („attention”), a tapasztalat („experience”), a memória, vagy a motiváció (Rees és mtsai., 2002; Baars és mtsai., 2003). Érezzük, hogy a tudat pszichológiai, vagy magatartástudományi definíciója nehézkes, mivel annak magasabb rendű és egyedi tartalmait objektíven definiálni lehetetlen.

A klinikai neurológia számos olyan megfigyelést tett, melyek segítik megérteni, hogy a pszichológiai gyakorlat által használt pusztán fenomenológiai fogalmak nem alkalmasak a tudat teljes tartalmának megragadására: közismert, hogy számos ún. perzisztens vegetatív állapotban (Persistent Vegitative State; PVS) vagy minimális tudati állapotban (Minimally Conscious State; MCS) levő páciens rendelkezik átmeneti deszinkron EEG aktivitással jellemezhető „ébrenléti” („wakefulness”) szakaszokkal, azonban tudatukat soha nem nyerik ezalatt vissza (Laureys, 2005). Ennél is közismertebb viszont a szomnambulizmus (alvajárás), mely során a páciens számos komplex szenzomotoros képességgel rendelkezik (nyomokban aktív, deszinkron EEG-képpel), ugyanakkor teljességgel nélkülözi a tudatos (frontális agykéreghez köthető) kontrollt (Schenck és mtsai., 1998; Plazzi és mtsai., 2005). Fogalmi

értelemben tehát el kell választanunk az ún. ébrenlétet („wakefulness”) és a tudatos állapotot is („awareness”) egymástól. Amennyiben természettudományos igényrel közelítünk a tudat definíciójához az egyre inkább zsugorodik, mivel számos attribútumát kiszorítjuk belőle a vizsgálhatatlan kategóriába miközben érezzük, hogy ezek a magasabb kognitív tartalmak - humán értelemben - *ab ovo* hozzátartoztak.

Az aneszteziológia, a neurológia valamint a kísérletes orvos- és idegtudomány ezért manapság egyezményesen külön vizsgálja a tudat tartalmait és a tudat mint állapot meglétét annak érdekében, hogy a tudatnak ezek a részei kísérletesen is megközelíthetőkké váljanak (Baars, 1995; Crick és Koch, 2003; Dehaene és Changeux, 2011). A humán agyi képalkotó eljárások révén mára egyértelmű, hogy a tudat különféle szintű tartalmainak idegi korrelátumai ún. „magasabb” agykérgi régiókhoz kötöttek (McIntosh és mtsai., 2003; Posner és mtsai., 2007; Desmurget és Sirigu, 2009), amíg a tudat - mint állapot - fenntartásában alapvető szerep jut olyan kéreg alatti struktúrák funkcionális összeköttetésének, mint az agytörzs vagy a thalamokortikális rendszer (Alkire, 2008; Tononi és Koch, 2008; Bonhomme és mtsai., 2012; Mashour és Alkire, 2013).

A modern biológiai tudományokban két évtizede jelen lévő rendszerszemlélet felállított egy ún. információ integrációs modellt, amely olyan elmélettel állt elő a tudat magyarázatára, amelyik úgy szintetizálja a meglevő ismeretanyagot, hogy nem vezet be újabb definiálhatatlan pszicho-fenomenológiai fogalmakat (Tononi és Edelman, 1998; Tononi, 2004; Koch, 2012). Dióhéjban ez a kurrens megközelítés az idegrendszerre olyan komplex rendszerként tekint, amelyben a tudatos állapot és az erre épülő mentális tartalom azáltal jöhet létre, hogy egyes részei egymással folyamatos funkcionális kapcsoltságban vannak és így képes a különböző információkat integrálni (Tononi, 2004; Edelman és mtsai., 2011). Így a tudat mint állapot az agy információ integráló kapacitásának meglétéhez kötött, melyhez a nagyagykéreg különböző részeinek funkcionális kapcsoltsága szükséges (Alkire és mtsai., 2008; Hudetz, 2012; Vizuite és mtsai., 2012). A részben már említett, bonyolult tudatos *tartalmak* pusztán az agykéreg belső

funkcionális szerveződéséhez kötöttek, ugyanakkor az agykéreg 'készenléti' állapotának fenntartását („információ integráló kapacitás”), mely alapvető feltétele a tudat - mint *állapot* - meglétének olyan kéreg alatti struktúrák biztosítják, mint a thalamus, az agytörzs, a hypothalamus és a bazális előagy bizonyos magcsoportjai. Ezt megfogalmazhatjuk úgy is, hogy ezen struktúrák úgy járulnak hozzá a tudatos állapot fenntartásához, hogy a magasan fejlett és specializált agykéreg funkcionális egységeit egymás számára elérhetővé teszik ('összeszervezik') a talamokortikális rendszerre kifejtett aktiváló („*arousal*”) hatásaikkal. Ahhoz, hogy az agykéreg képes legyen tudatos processzióra ezek a szubkortikális idegi hatások elengedhetetlenek. Azt állítjuk, hogy a tudatos *állapot* egy fundamentális agyi képesség, mely gradált, és mint képesség jelen van az újszülöttekben és az állatokban is (Tononi, 2004, 2008).

Itt fontos tisztáznunk, hogy amit a dolgozatban ezentúl *tudat*-ként említünk, azt csak a fent kifejtett, legegyszerűbben értelmezhető tudatos *állapotra* („core consciousness”) értjük. Ez az állapot kísérleti állatainkban deszinkronizált (aktív) EEG-vel, készenléti izomtónussal jellemezhető. Elvesztéséhez ugyanakkor nagy amplitúdójú, lassú EEG aktivitás, atónia, areflexia és a kérgi reaktivitás megszűnése köthető. Az ehhez szorosan kapcsolódó és a jövőben szintén gyakran használt *arousal* kifejezésen szigorúan csak azokat az idegi aktivációs hatásokat értjük, melyek - magatartási értelemben – biztosítják az állat éberségét („vigilancia”), vagy elektroencefalográfiás aktivációt, azaz EEG deszinkronizációt okoznak. Az *arousal* kifejezés a pszichológiában és a kognitív tudományokban ugyanis egyéb, sokkal összetettebb jelentésben használatos, mely jelentéstartalmak semmiképpen sem tartoznak majd az általunk használt '*arousal*' kifejezéshez.

Az alvás és ébrenlét kutatásának egyik fontos eredménye a szenzoros információkat a kéreg felé továbbító thalamikus, hypothalamikus és agytörzsi struktúrák funkcionális változásainak a feltárása. Az agytörzs anatómiájának és fiziológiájának irodalma éppen ezért jelentősen az alváskutatáshoz kötődik (Steriade és McCarley, 1990). Ennek okán a téma bevezetésében irodalmi hivatkozásokon keresztül igen gyakran, az eredményeink ismertetésében pedig

csupán érintőlegesen fogunk kapcsolódni az alváskutatáshoz. Fontos azonban tisztázni, hogy a dolgozatban ismertetésre kerülő munkában csak az ARAS három különböző magcsoportjából elvezetett egysejtaktivitások alvás-ébrenléti ciklusokhoz rendelése tekinthető az alváskutatáshoz kapcsolódónak, de a többi vizsgálatból származó eredmény nem alváskutatás jellegű. A vizsgált struktúrák szorosan kapcsolódnak az alvás-ciklusok szabályozásához melyek révén a tudatunkat naponta elveszítjük. Azonban fontos hangsúlyozni, hogy a vizsgált, tudatvesztéssel járó patológiás állapotok – nevezetesen a generális anesztézia és a vegetatív állapot – minőségileg különböznek a nagyon bonyolultan szabályozott alvás állapotaitól, emiatt a dolgozattal szemben nem támasztható alváskutatói elvárás, igényesség.

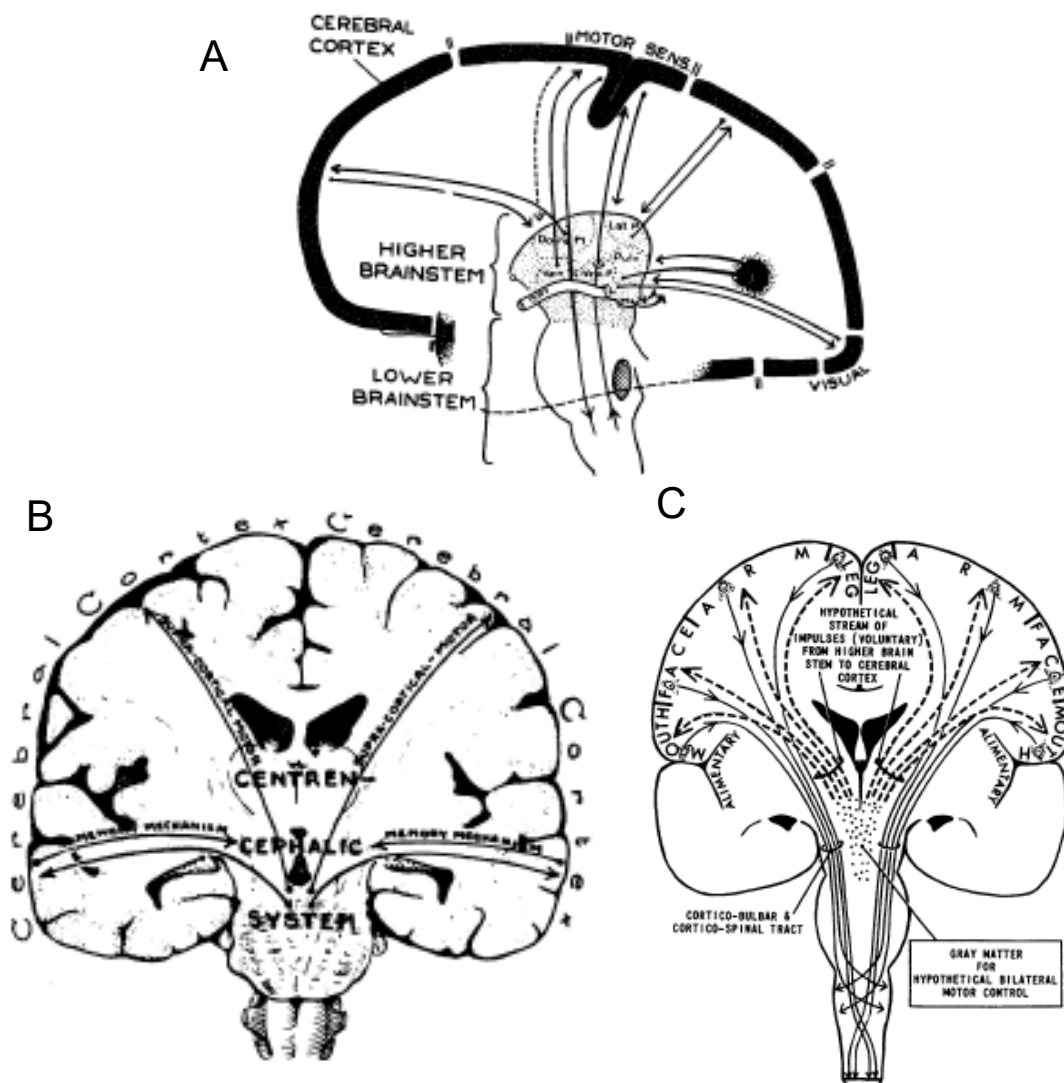
1.3 AZ AGYTÖRZS SZEREPE A TUDATOSSÁG FENNTARTÁSÁBAN

A *formatio reticularis*-hoz kapcsolható irodalom könyvtárnyi és redundáns (tematikus és terminológiai értelemben is), ezért kimerítő tárgyalása meghaladná ennek a dolgozatnak a kereteit. Emiatt kénytelenek leszünk az áttekintés során nélkülözni a teljesség igényét és csak a témához szorosan kapcsolható, legszükségesebb irodalmi adatokat ismertetni.

1.3.1 „Centrencephalikus” integráló rendszer

Különböző epilepsziás kórképekhez gyakran kapcsolódik tudatmódosult, vagy tudatvesztéses állapot. Az epilepsziás rohamok tanulmányozásával alkalom nyílik dinamikus állapotban vizsgálni a tudatos állapot eltűntének anatómiai és fiziológiai mechanizmusait. A Wilder Penfield (1891-1976) nevéhez köthető „centrencephalikus integráló rendszer” koncepciója humán epilepsziás betegeken elvégzett sebészeti beavatkozások tapasztalatai alapján született meg. Számos kísérlet eredményeit Penfield úgy összesítette, hogy az agytörzs és a diencephalon tartalmaz egy ún. „centrencephalikus integráló rendszert” (1.1

ábra), amely a felsőbb idegrendszeri struktúrák működését befolyásolja és hatása szükséges ahhoz, hogy a páciens „tudatos-perceptuális” vagy „célzatos” viselkedésre legyen képes (Penfield, 1952). Fontos megjegyezni, hogy a koncepció már Moruzzi és Magoun klasszikussá vált kísérletei (Moruzzi és Magoun, 1949) előtt megszületett, tehát az ARAS elektrofiziológiai bizonyítását megelőzően, ezért Penfield helye méltán lehet a bevezetésben említett génuszok között. Fontos ezt hangsúlyoznunk azért, mert elmélete túlságosan mellőzöttnek tekinthető és számos félreértés övezi. Az elutasítottság egyik oka az a félreértés volt, hogy sokan a *centrencephalon* kifejezést úgy értették mintha tartalmazná a tudatot melyet csupán továbbít az agykéreg felé, ezért sokan a kartéziánus gyökerű centrizmushoz sorolták, pedig Penfield funkcionálisan sosem szeparálta a *formatio reticularis*-t az agykéregtől, ahogy fogalmaz: *„A tudatosság az agytörzs és az agykéreg között folyamatosan úton levő és változó idegi impulzusok asszociációjából származik. Sosem mondtam azt, hogy a tudat itt van, vagy ott van, csak azt, hogy a centrencephalikus integráló rendszer épsége nélkül nem létezhet”* (Penfield, 1975). Természetesen a celluláris idegtudomány számos esetben kiigazította, finomította a koncepciót, ugyanakkor az epilepszia révén létrejövő tudatvesztést modern képalkotó eljárásokkal nyert meggyőző adatok összesítéséből létrehozott ún. 'hálózati inhibíciós hipotézis' (**1.2 ábra**) szinte újfogalmazta Penfield meglátásait (Blumenfeld és Taylor, 2003; Blumenfeld és mtsai., 2009).

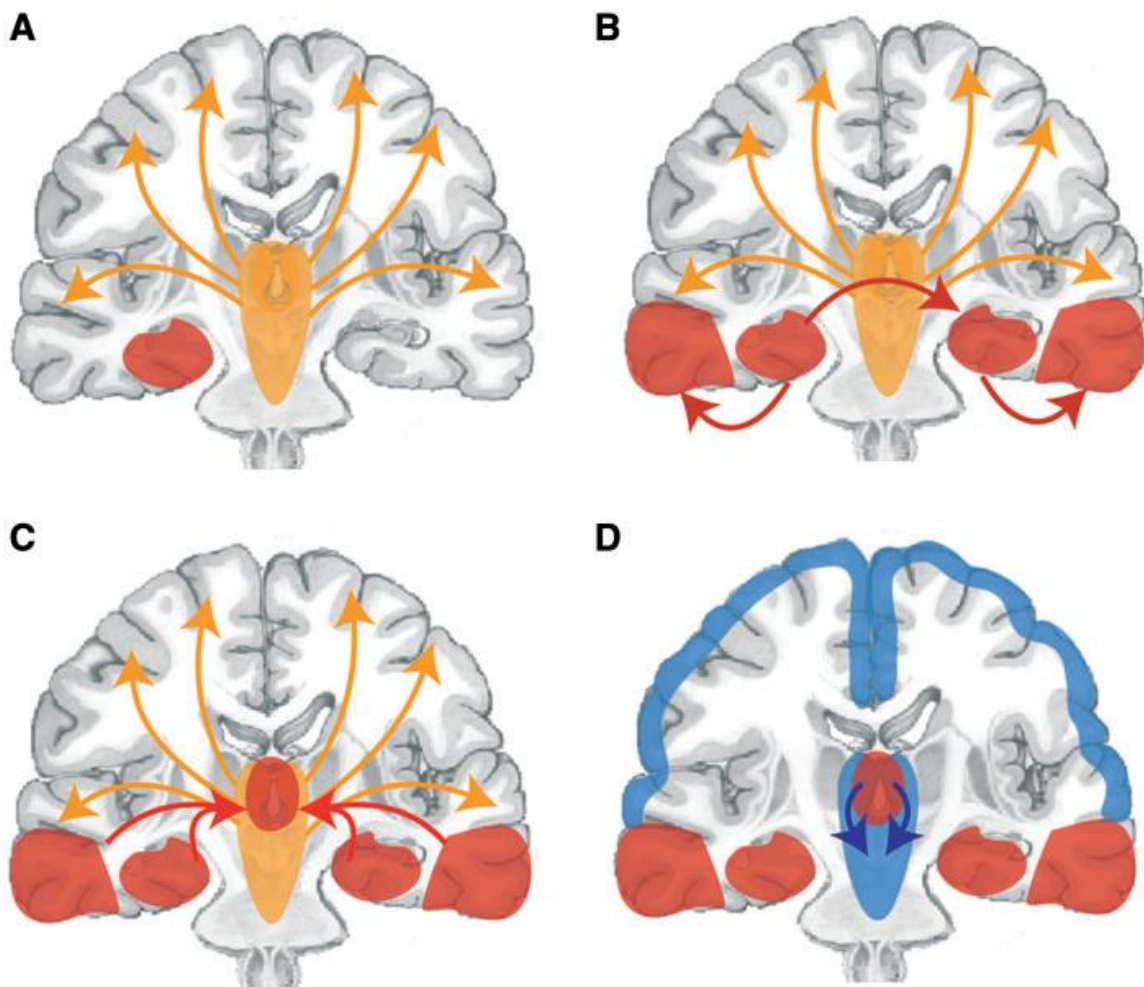


1.1 ábra A centrecephalikus integráló rendszer kialakulásának stádiumai. (A) Penfield koncepciójának korai változata, melyben a thalamus és az agytörzs még külön ábrázolt (Penfield, 1936). (B) A thalamus és az agytörzs itt már egy funkcionális egység (Penfield, 1952). (C) A végső változat, melyben szerepelnek a bilaterális motoros kontroll agykérgi szabályozó régiói és kiemeli az agytörzsi és thalamikus hatást (Klemm, 1972a; Penfield, 1975).

Amíg a generalizált (*absence*, vagy tónusos-klónusos) rohamok szinte mindig, addig a parciális (szimpla- vagy komplex-parciális, temporális lebenyhez köthető) rohamok csak alkalomadtán járnak tudatvesztéssel. Ezt - a 'hálózati inhibíciós hipotézis' szerint - ugyanazoknak az idegi hálózatoknak a megváltozott működése okozza, de ellentétes fiziológiai karakterisztikával

(Blumenfeld, 2009). Ez röviden úgy foglalható össze, hogy a generalizált epilepsziák ún. nagyrohamos tónusos-klónusos típusának (Generalized Tonic-Clonic Seizure, GTCS) esetén az egy foton emissziós computer tomográfiás (Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT), fMRI-BOLD és fMRI-CBF (Cerebral Blood Flow, CBF) aktivitás markánsan megnövekedik iktálisan az agytörzsben, a thalamus nem-specifikus középvonali magjában és a középvonali kérgék fronto-parietális asszociációs régióiban, ugyanakkor csökken a prefrontális- és posterior cinguláris kérgekben. Érdekes módon a fronto-parietális asszociációs kérgekben posztiktálisan (mely időszak ebben a típusban az iktális szakaszhoz hasonlóan tudatvesztéssel telhet) viszont jelentősen csökkent aktivitás figyelhető meg a fenti képalkotások során. A generalizált epilepszia másik elterjedt típusában, az ún. *absence* rohamok, alatt igen hasonló az aktivitások időbeli megváltozása a felsorolt agyterületekben azzal a különbséggel, hogy iktálisan a fronto-parietális asszociációs kérgekben növekedés és csökkenés is egyaránt megfigyelhető bilaterálisan (Blumenfeld, 2009). Ez jól egybeesik azzal a megfigyeléssel, hogy az *absence* rohamok alatt a percepció zavarokhoz és hallucinációkhoz vissza-visszatérően, csak rövid időszakokra társul teljes tudatvesztés (Monaco és mtsai., 2005).

Egészen napjainkig a parciális epilepszia során az iktálisan fellépő tudatzavarokkal az említett középvonali kérgeket és szubkortikális struktúrákat nem tudták összefüggésbe hozni, emiatt nagy kihívást jelentett a főképp temporális lebenyhez köthető, komplex-parciális rohamokkal járó tudatvesztés magyarázata. Az elmúlt években mind állatkísérletekben (Englot és mtsai., 2009), mind pedig humán kísérletekben (Englot és mtsai., 2010) elvégzett fMRI-BOLD és elektrofiziológiai mérések kombinációi bizonyították azt, amire már előzőleg SPECT adatok is utaltak (Lee és mtsai., 2002), miszerint a komplex-parciális rohamok a temporális lebenyekről áttérjednek az agytörzs és a diencephalon középső állományára, és ezáltal indirekt úton okoznak eszméletvesztést (**1.2 ábra**).



1.2 ábra A 'hálózati inhibíciós hipotézis' a komplex-parciális rohamok alatt fellépő eszméletvesztést magyarázza. (A) Normál körülmények között az agytörzsi – diencephalikus aktiváló rendszer és a középilonali kérgék finom interakciója ép, ezáltal a tudatos állapot fenntartott (sárga jelzés). Egy meziális temporális, fokális roham eleinte csak unilaterális (piros mező). Abban az esetben, ha a roham nem terjed át a másik temporális lebenyre, azaz szimpla-parciális roham marad, a tudatos állapot nem sérül. (B) A meziális temporális roham áttérjedése az ipsilaterális laterális temporális lebenyre és a kontralaterális temporális lebenyre. (C) A bilaterális temporális rohamok terjednek át a középilonali diencephalonra. (D) Ennek hatása lerombolja az agytörzsi ARAS aktiváló kapacitását (kék nyíl és mező), melynek következtében dramatikusan csökken az aktivitás a bilaterális fronto-parietális asszociációs kérgékben (kék mező), mely a végső oka a komplex-parciális rohamok alatt fellépő tudatvesztésnek.

(Blumenfeld, 2009)

A generalizált epilepsziák után a komplex-parciális rohamok alatt létrejövő eszméletvesztést is magyarázhatjuk tehát azzal, hogy azon struktúrák funkcionális állapota változik meg a rohamok során, melyek finom interakciója felelős a tudat fenntartásáért az ébrenlétben. Normál körülmények között az agytörzsi-diencephalikus rendszer tartja fenn az összehangoltságot a fronto-parietális magasabb kérgék között, melyek bonyolult funkcionális kapcsolatának megléte szükséges feltétele az ép tudatos állapotnak (Alkire és mtsai., 2008; Hipp és mtsai., 2011).

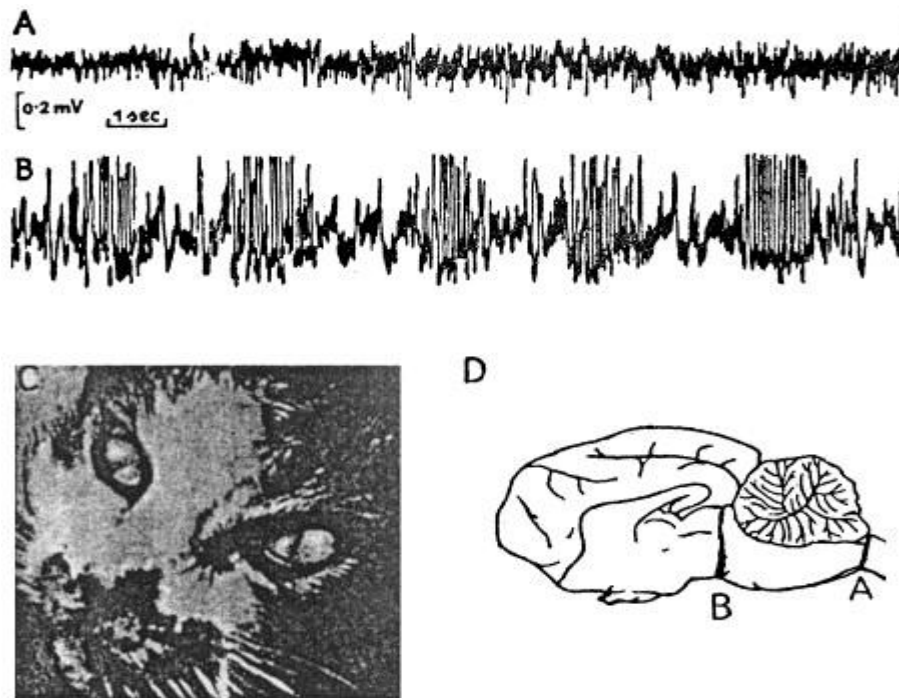
A különböző epilepsziák kapcsán módosult tudati állapotok alatt elvégzett agyi képalkotások során nyert funkcionális anatómiai profilok nemcsak alapkutatási jelentőséggel bírtak, hanem az ezek alapján megalkotott egyszerű neuropszichiátriai kérdőív az ún. 'roham alatti tudatos tartalmi leltár' (ICl.: Ictal Consciousness Inventory) áttörést ért el a különböző epilepszia- és rohamtípusok helyszíni diagnosztizálásában, felmérésében (Cavanna és mtsai., 2008; Cavanna és Monaco, 2009). A kérdőív visszakérdez az iktális epizód alatti tudati tartalmak minőségére és a felidézhetőség segítségével azok relatív mértékére, melyek kategorizálása után, már a helyszínen is könnyen osztályozható az epilepszia és a rohamok típusa és súlyossága. Így a diagnosztika indirekten képes következtetni, hogy mely agyi régiók érintettek a roham által és - mivel az agytörzsi érintettség közvetlenül veszélyezteti az életfunkciókat - a sürgős esetekben azonnal képes beavatkozni.

Megállapíthatjuk, hogy Penfield 'centrencephalikus integráló rendszer' teóriáját - melyet úgyszintén az epilepszia, és ennek kapcsán elvégzett sebészeti beavatkozások tudatosságra kifejtett hatásai alapján alkotott meg – a modern idegtudományok teljes mértékben igazolták.

1.3.2 Felszálló aktiváló rendszer (ARAS)

Frederic Bremer (1892-1982) - Penfield 'centrencephalicus integráló rendszer' hipotézisének megszületésével szinte egy időben – 1935-ben demonstrálta, hogy ha teljes átmetszést végez el macskák nyúlt velőjének

kaudális részén (*'encéphale isolé'*) az állat jóllehet paralizálódik (ezért lélegeztetni kell), de arousabilis marad és az alvás-ébrenléti ciklus is megartott (1.3 ábra A, D (A)). Amikor viszont ún. intercollicularis átmetszéssel (*'cerveau isolé'*), a mesencephalon szintjén ejtett teljes átmetszést akkor az állat képes volt ugyan spontán lélegezni, de tudatát elvesztve, vegetatív állapotba került atóniával, lassú-hullámú EEG-vel (1.3 ábra B, D (B)) és mióziissal (1.3 ábra C) (Bremer, 1935).



1.3 ábra Frederic Bremer agytörzsi átmetszéseinek hatásai.

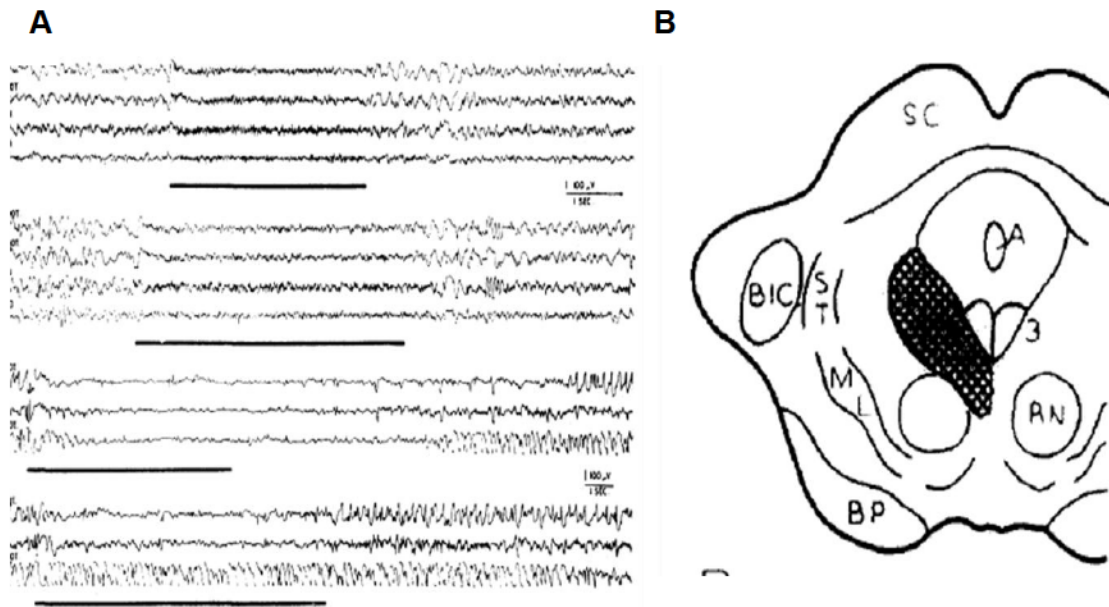
(A, D (A)) Az *'encéphale isolé'* preparátum és hatásai (B, C, D (B)) A *'cerveau isolé'* preparátum és hatásai. Részletek a szövegben.

(Bremer, 1935)

Mivel minden afferens szenzoros agyideg a két átmetszés között érkezik be a központi idegrendszerbe, Bremer feltételezte, hogy a *'cerveau isolé'* preparálása után jelentkező, alvásra jellemző hiperszinkron EEG képet és a hozzá társuló tüneteket egyszerűen csak a szenzoros információk kortikális deafferentációja okozza. Kísérletei alapján megfogalmazta az alvás ún. szenzoros deprivációs teóriáját, mely később az alvás passzív hipotézisének alapjául szolgált. E

passzív hipotézis értelmében az alvás nem egyéb, mint az aktív ébrenlét hiánytüneteként kialakuló állapot.

Bremer egyik diákja Giuseppe Moruzzi (1910-1986) és Horace Magoun (1907-1991) azonkívül, hogy léziós technikával pontosította Bremer preparátumainak pontos anatómiáját, mély-agyi mikrostimulációs technikával, fiziológiailag is körülírta az '*arousal*'-ért felelős struktúrákat és evvel bevezette az ARAS fogalmát (Moruzzi és Magoun, 1949). Klasszikussá vált kísérleteiket, melyekben bizonyították az ARAS létezését kloralózban altatott, atropinizált macskákon végezték el (Moruzzi és Magoun, 1949). Az ARAS pontos helyét úgy definiálták, hogy mind intakt (**1.4 ábra A** alul), mind pedig izolált agytörzsű állaton ('*encéphale isole*') (**1.4 ábra A** felül) megvizsgálták, hogy mely anatómiai lókuszt képes hatékonyan deszinkronizálni az agykérgi EEG-t, azaz ébreszteni az anesztéziát. Kísérleteikben a mesencephalik formatio reticularis (MRF) bizonyult a leghatékonyabbnak (**1.4 ábra B**), így ezt a struktúrát jelölték meg az ARAS fő forrásának. A fent részletezett kísérletsorozatban Moruzzi és Magoun összetett ingerlések egymásra hatásaiból indirekten feltételezte, hogy a MRF a thalamus „diffúz” (aszpecifikus) projekcióin keresztül fejt ki aktiváló hatását az agykéregre. Ezt pontosan egy időben, léziós technikákkal, mások is igazolták kiegészítve azzal, hogy a bazális előagy bizonyos részei is lehetséges mediátorai az '*arousal*' hatásoknak (Lindsley és mtsai., 1949). Az aktivációs paradigma az ARAS leírásával nyert igazolást a neurológiai tudományokban és példátlan klasszikus (mikrostimulációs és léziós) kísérletes erőfeszítésekre sarkallta a kutatókat az ezt követő három évtizedben, melyet a modern neurobiológia a legkülönbözőbb módszerekkel a mai napig folytat (Fuller és mtsai., 2011; Martin és mtsai., 2011; Mhuircheartaigh és mtsai., 2012).



1.4 ábra A felszálló aktiváló rendszer (ARAS). (A) A bal MRF stimulációjának hatásai az EEG-re intact (alsó hat, 2x3 EEG szakasz, stimuláció paraméterek: 3 V, 300 Hz és 100 Hz az a legalsó 3 EEG szakaszban, kalibráció: 100 mV, 1 sec.) és 'encephalé isole' (felső nyolc, azaz 2x4 EEG szakasz, stimuláció paraméterek: 1,5 V, 300 Hz, kalibráció: 100 mV, 1 sec.) preparált, kloralózbán alátartott macskában. Generalizált 'arousal' válasz (deszinkronizáció) az agykérgi EEG elvezetésekben a stimuláció alatt (fekete vonal). A felső két négyes elvezetésben a legfelső szakasz a bal szenzo-motoros kérgi, alatta a jobb szomato-motoros kérgi, míg a legalsó szakasz a két Gyrus Proreus és felette a két Gyrus Cruciatu interhemiszférikus elvezetése látható. Az alsó két hármass elvezetésben a felső csatorna a bal szenzo-motoros kéregről, a középső csatorna a bal vizuális kéregről és az alsó csatorna a jobb szomato-motoros kéregről vezet el. Jól látható, hogy az izolált agytörzsű állatokban a kérgi aktiváció csak a stimuláció ideje alatt van jelen bilaterálisan, míg az intact állatokban ipszilaterálisan tartósabban fennmarad. (B) A mesencephalon keresztmetszeti képén keresztsávozással jelölt az a terület, mely már a legalacsonyabb erősségű ingerlésre is maximális aktivációs választ vált ki az agykérgen. Moruzzi és Magoun ide lokalizálta az ARAS anatómiai szubsztrátumát. Rövidítések: SC: Colliculus Superior, A: Aqueductus, 3: Nucleus Oculomotorius, RN: Nucleus Ruber, BIC: Brachium Inferior Colliculus, ST: Tractus Spino-thalamicus, ML: Lemniscus Medialis, BP: Basis Pedunculi

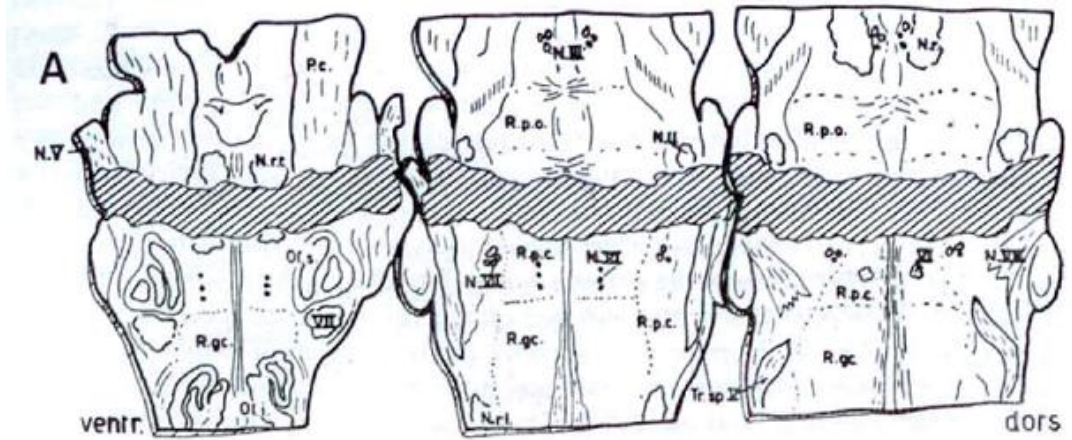
(Moruzzi és Magoun, 1949)

AZ ARAS megtalálása után a sebészet fejlődésével Moruzzi kutatócsoportjának léziós technikával sikerült pontosítani azt, hogy mely agytörzsi struktúra épsége esszenciális az 'arousal'-hatás kiválthatóságához (Batini és mtsai., 1958). Akut kísérletükben sikerült igazolniuk, hogy létezik egy kritikus rostrális hídi régió melynek roncsolása vagy leválasztása a nagyagyról

olyan perzisztens lassú-hullámú aktivitást eredményez, mely a lassú-hullámú alvásra és a kómára jellemző **(1.5 ábra B)**. Ugyanakkor, ha az átmetszést néhány milliméterrel kaudálisabban hajtották végre (ún. pretrigeminális átmetszés), mindkét oldali EEG tartós deszinkronizációt mutatott, mely normálisan az ébrenlétre jellemző **(1.5 ábra A)**. A kísérlet tisztázta, hogy a híd anterior részének épsége, mely tartalmazza a Nucleus Laterodorsalis-t (LDT), a Nucleus Pedunculopontinus Tegmentalis-t (PPT) és a Nucleus Reticularis Pontis Oralis-t (PnO), szükséges ahhoz, hogy az '*arousal*' előhívható legyen. Ezenkívül nyilvánvalóvá tette azt is, hogy a szenzoros bemenetek csak másodlagos jelentőséggel bírnak az ébrenléti tónus kialakításában, valamint utalt arra, minthogy a kaudális átvágás hatására létrejött deszinkron EEG szokatlanul hosszan fennállt, hogy a híd poszterior részének aktív szerepe is lehet az alvás indukciójában.

Nemsokára mikrostimulációs technikával elvégzett kísérletek is bizonyították a fenti eredményeket, miszerint az alacsonyabb hídi *formatio reticularis* is tartalmazza az ARAS-t **(1.6 ábra A)** (Bonvallet és Newman-Taylor, 1967). A léziós és stimulációs kísérletek eredményeképp felgyűlt tudás számos ellentmondást és bizonyítatlan hipotézist szolgáltatott a tudomány számára. Ahhoz, hogy ezeket felszámolja Klemm elhatározta, hogy szisztematikusan végigstimulálja az egész középagyi és agytörzsi területet. Eredményei bizonyították, hogy az EEG-t leghatékonyabban deszinkronizáló lókuszt a PnO (Klemm, 1972a) **(1.6 ábra B)**, és az innen kiváltott '*arousal*'-válasznak megfelelő deszinkronizáció az unilaterális stimuláció után is tartósan és generalizáltan fennmarad, sokszor mint theta aktivitás (Klemm, 1972b).

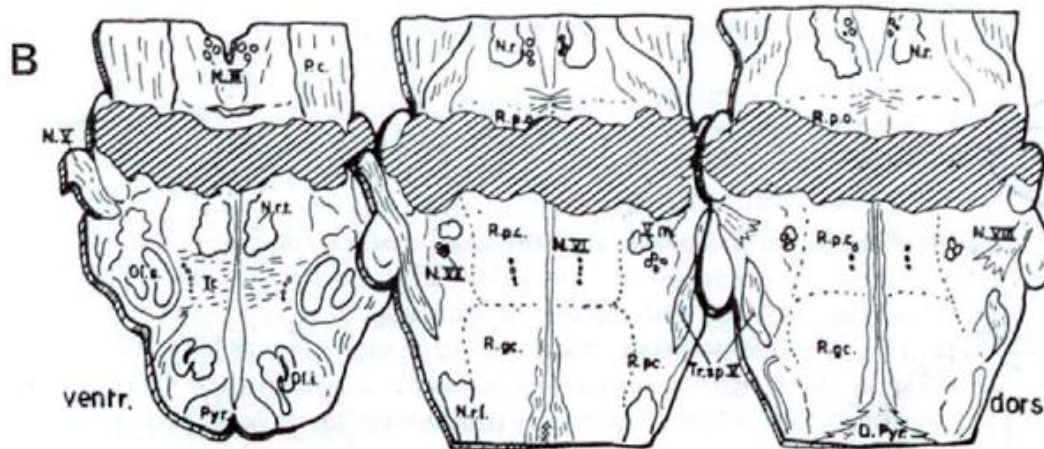
Speciális diatermokoagulációs technikával is sikerült bizonyítani, hogy csupán a PnO szelektív lézionálása is elegendő a komatikus állapot krónikus létrehozásához (Camacho Evangelista és Reinoso Suarez, 1964) **(1.7 ábra)**.



F.d.

F.s.

1 sec — 100 μ V I



F.d.

F.s.

1.5 ábra A rostrális hídi- (B) és a kaudális hídi átmetszés (pretrigeminális) (B) a macska agytörzsének horizontális metszetén és ezek hatásai a frontális kérgi EEG-re. Az EEG elvezetések a jobb frontális (F.d.) és a bal frontális (F.s.) lebenyről történtek. A keresztsávozott mező jelzi a lézionált területet (fontos megfigyelni, hogy mindkét átmetszés roncsolja a felszálló trigeminus ágat. Rövidítések: ld. következő oldal.

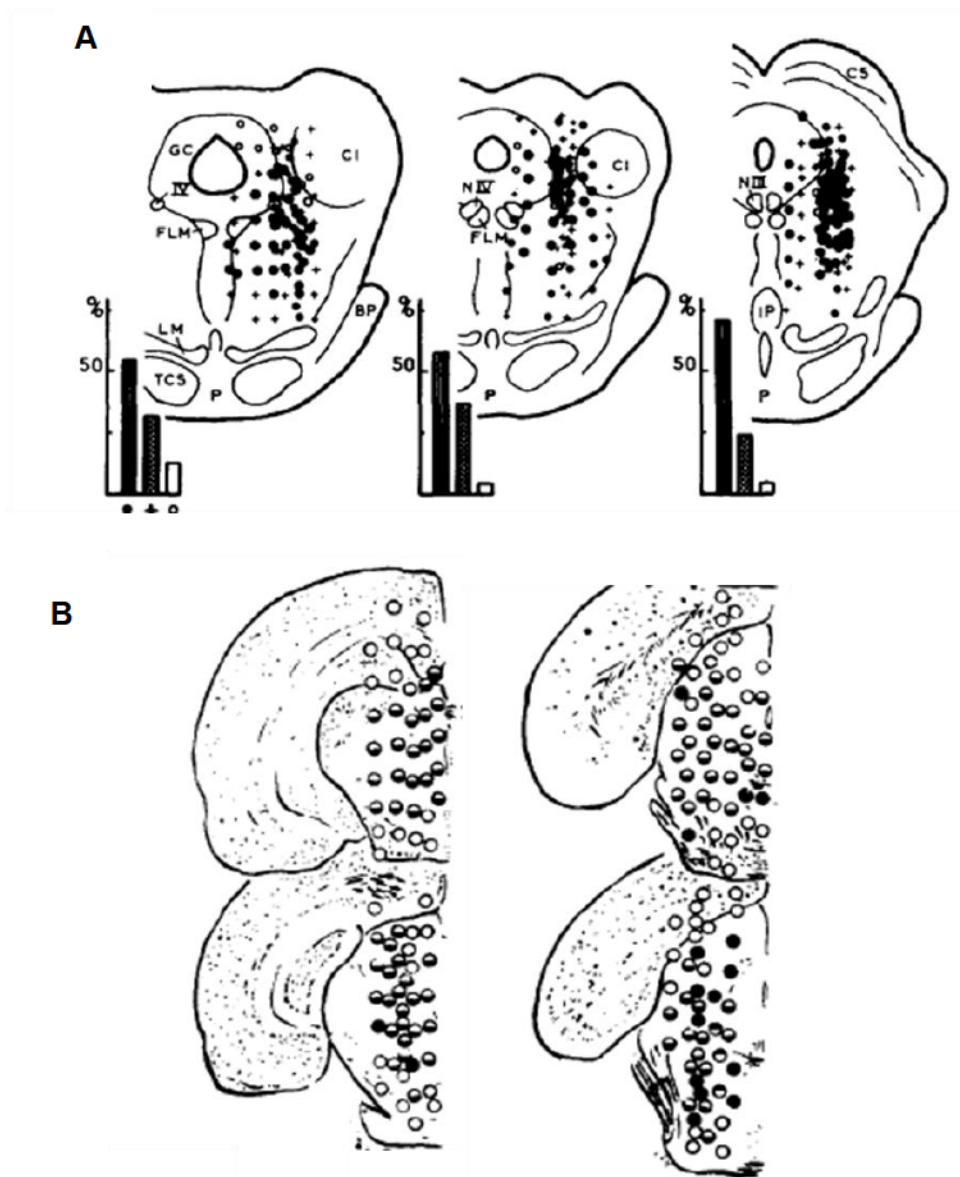
(Batini és mts., 1958)

Ezenkívül bebizonyosodott az is, hogy a Nucleus Reticularis Pontis Caudalis (PnC) területének lézionálása viszont képes tartósan aktiválni az agykérgi EEG-t. Az eredmények tükrében Chamacho-Evangelista és Reinoso-Suarez a PnO-t mint aktiváló centrum, a PnC-t és a tőle dorzálisan és laterálisan elhelyezkedő bizonyos területeket pedig szinkronizáló centrumként azonosította (Camacho Evangelista és Reinoso Suarez, 1964) (**1.7 ábra**).

Ekkorra már élesen jelen volt az irodalomban a formális vita az alvás passzív- és aktív teóriájáról, melynek a fenti és a ahhoz hasonló léziós kísérletek szolgáltatnak táptalajt és amelyet már részben érintettünk. Felidézésképpen az egyik szerint (passzív teória) az alvás nem egyéb, mint a szenzoros bemenetek hiányában kialakuló állapot, míg a másik szerint (aktív teória) specifikus idegi elemek aktív hatása kell az alvás indukciójához. Érdekes módon a paradox, vagy gyors szemmozgásos alvás (REM; Rapid Eye Movement) leírója Nathaniel Kleitman (1895-1999) is az alvás passzív teoretikusai közé tartozott. Óriási jelentőségű felfedezése melyben elkülönítette a REM alvást a lassú-hullámú- (SWS; Slow-Wave Sleep) avagy gyors szemmozgással nem járó (NREM; Non Rapid Eye Movement) alvástól bizonyította, hogy az alvás nem egységes, ugyanakkor a létrejöttét ő is csak a passzív teóriával magyarázta (Aserinsky és Kleitman, 1953). Az alvás aktív teóriájának kezdete báró Constantin von Economo (1876-1931) megfigyeléséhez köthető, mely inszomniában szenvedők agyának *post mortem* elemzéséből kiindulva feltételezte, hogy a hypothalamus anterior részének a Chiasma Opticum mellett (preoptikus área) és a bazális előagynak a léziója vezetett a kórképhez (von Economo, 1930).

1.5 ábra folyt.: rövidítések: D.Pyr.: Decussatio Pyramidum, N.I.I.: Nucleus Lemnisci Lateralis, N.r.: Nucleus Ruber, N.r.l.: Nucleus Reticularis Lateralis, N.r.t.: Nucleus Reticularis Tegmenti Pontis, N.III, V, VI, VII, VIII.: Agyidegmagvak, Ol.i.: Nucleus Olivaris Inferior, OL.s.: Nucleus Olivaris Superior, P.C.: Pes Pedunculi Cerebri, Pyr.: Pyramis, R.gc.: Nucleus Reticularis Gigantocellularis, R.p.c.: Nucleus Reticularis Pontis Caudalis, R.pc.: Nucleus Reticularis Parvocellularis, R.p.o.: Nucleus Reticularis Pontis Oralís, Tr.: Corpus Trapezoideum, Tr.sp. V.: Tractus Spinalis Nervii Trigemini, Vm, VI, VII.: Motoros agyidegmagvak

(Batini és mts., 1958)



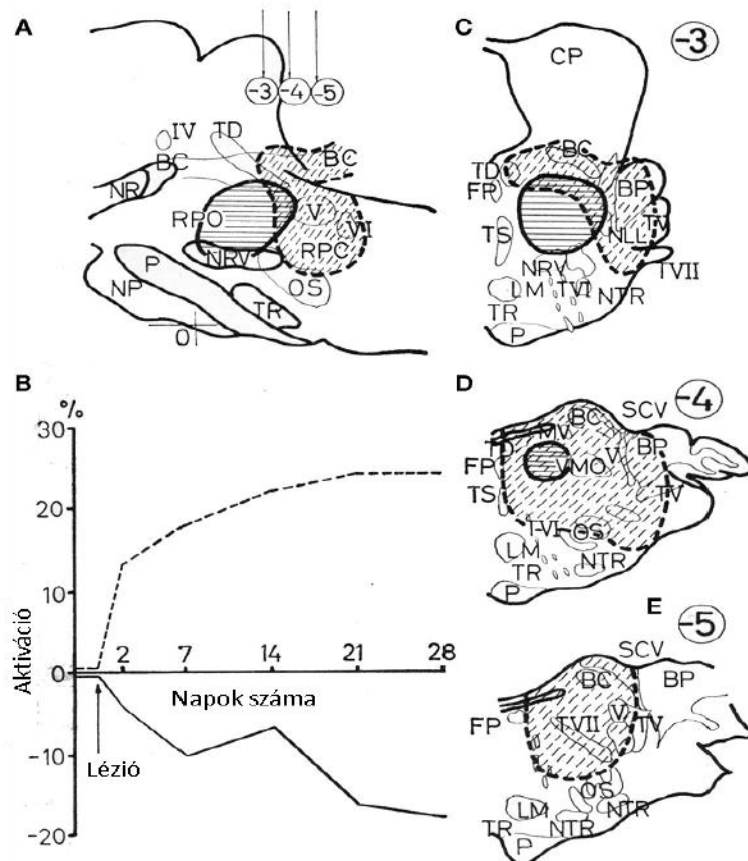
1.6 ábra Mikrostimulációs kísérletek, melyek bizonyítják, hogy a PnO az ARAS fő komponense. (A) Bonvallet és Newman-Taylor bizonyította, hogy az alacsonyabb híd is tartalmazza az ARAS-t. A telt körök jelzik azokat a pontokat ahonnan tartós-, az üres körök ahonnan rövid-, és a kereszttek ahonnan közepes időtartamú hatásokat tudtak elérni a stimuláció révén (az oszlopdiagrammok ezek százalékos megoszlását jelzik az adott anatómiai síkban). Megfigyelhető, hogy a PPT, az LDT és a PnO területére lokalizálhatók a legsikeresebb stimulációk. (B) Klemm nemcsak az EEG-re, hanem az elektromiogramra (EMG) kifejtett aktiváló hatást is megvizsgálta. Az üres körök a hatástalan lókusztokat, a tele körök azokat a helyeket, amelyek mind az EEG-re, mind az EMG-re aktivációval hatottak, az alul telt körök pedig csak az EEG-re ható, a felül teltek pedig csak az EMG-re ható stimulációs pontokat jelzik. (folytatás: ld. következő oldal)

Azokban, akikben viszont hiperszomnolenciát figyelt meg, a poszterior hypothalamusban írt le léziót. Báró von Economo predikciója, miszerint az anterior hypothalamus preoptikus régiója alvást képes indukálni, míg a poszterior hypothalamus ébrenlétet aktivál azóta igaznak bizonyult (Nauta, 1946; Saper és mtsai., 2001; Saper, 2006). Számos újabb tanulmány is megerősítette azóta, hogy a hypothalamus preoptikus áréája hipnogén központ, ugyanis ha bilaterálisan a gátló neurotranszmitter γ -amino-vajsav (γ -aminobutyric acid, GABA) agonistáját (muscimol) injektáltak a preoptikus zónába, az állatok inszomniások lettek (Lin és mtsai., 1989). Mikroelektrofiziológiai módszerrel is leírták azokat a GABA-erg sejtcsoportokat, melyek legmagasabb tüzelési rátája a lassú-hullámú alvás folyamán volt és amelyek efferens projekciói gátolták az ébrenlétet indukáló ARAS sejtcsoportjait (Sherin és mtsai., 1996; Szymusiak és mtsai., 1998). Ezeket az eredményeket sokan az aktív alvásteória igazolásának tekintették és sajnos tekintik a mai napig is. Fontos azonban tisztázni, hogy az alvás passzív-, aktív teóriái - mint munkahipotézisek - használhatatlannak bizonyultak és jó példái annak a fenomenológiai nominalizmusnak, melyet joggal tekinthetünk kerülendőnek a tudományos megismerésben. A jó munkahipotéziseket azért állítunk fel ugyanis, hogy kísérletesen jól vizsgálható, köztes kérdésekkel lássa el és így módon tesztelhetővé tegyék a kísérleteket. Az aktív,- passzív alváshipotézisek azonban bizonyos nézőpontokból igaznak is és hamisnak is vehetők, ilyen értelemben ezek ma már az elavult teóriák közé sorolhatók. Amennyiben az alvásra, mint cirkadián biológiai ritmusra, tekintünk, melyben az arousabilitás napi ritmusban változik meg, és amelynek időzítését a szuprakiazmatikus mag adja és hatását a hypothalamus hipnogén sejtjei közvetítik (Aschoff, 1967; Aston-Jones és mtsai., 2001), úgy az aktív alvásteória igaznak vehető.

1.6 ábra folyt.: Megfigyelhető, hogy az EEG-re leginkább ható pontok a PnO-ba lokalizálhatók. Rövidítések: CI.: Colliculus Inferior; BP.: Brachium Pontis, GC.: Griseum Centrale, FLM. : Fasciculus Longitudinalis Medialis, IV. : Negyedik agyideg, LM.: Lemniscus Medialis, TCS.: Tractus Corticospinalis, P.: Pyramis, IP.: Nucleus Interpeduncularis

(Klemm, 1972a), (Bonvallet és Newman-Taylor, 1967)

Ugyanakkor továbbra is teljes mértékben igaz, hogy emlősökben a szendergéshez, mely az alfa-aktivitás dúsulásával jár az occipitális EEG-n és amely az alvás-ciklus előszobájának tekinthető, szükséges a szem becsukása, valamint a halk és nyugodt környezet (szenzoros depriváció) (Hughes és mtsai., 2004), mely látszólag a passzív hipotézist támogatja.



1.7 ábra Aktiváló és szinkronizáló központok a hídi tegmentumban. (A, C-E) Anatómiai területek melyek léziója szinkronizálja az EEG-t (vízszintesen sávolt területek; 'Aktiváló centrum') és amelyek léziója aktiválja az EEG-t (szaggatott, átlós sávolás, 'Szinkronizáló centrum'). A parasagittális metszeten (A) látható körök reprezentálják a horizontális metszetek síkjait (C-E), a Reninoso-Suarez (1961)-atlasz koordinátái alapján. (B) A lézionálás krónikus hatásai az EEG relatív aktivációs százalékaira. Látható, hogy a fő aktivációs centrumot a PnO területére lokalizálták, míg a szinkronizáló centrumot tőle kaudálisabban a PnC és az ún. parafaciális zónára lokalizálták. (folytatás: ld. következő oldal)

Mára bizonyos az is, hogy az agytörzsben vagy az agytörzsön kívül elhelyezkedő alvást vagy éppen az 'arousal'-t indukáló neuron populációk képesek egymás hatásait antagonizálni, vagy gradált-módon gátolni a köztük húzódó projekciós GABA-rendszeren keresztül (Lu és mtsai., 2006a; Saper, 2006). Látható tehát, hogy a normális alvás-ébrenléti ciklus és a vele járó különböző fiziológiai attribútumok (EEG-kép, EMG-állapot stb.) létrejöttébe igen bonyolult rendszerek egymásra hatásának egyensúlyából alakul ki, és ily módon szabályozásának bonyolultsága révén túlnő az aktív vagy passzív hipotéziseken, melyeknek mára már joggal csak tudománytörténeti jelentőséget tulajdoníthatunk.

AZ ARAS felfedezése óta az alváskutatás óriási utat tett meg abban, hogy feltárja a kéreg alatti struktúrák alvás-ébrenléti ciklust szabályozó szerepét. Mára már köztudott, hogy számos agytörzsi, vagy agytörzsön kívüli struktúra (és ezek egyes speciális idegsejt populációja) egyaránt fontos szerepet játszik az aktív ébrenlét és az alvás létrehozásában és/vagy fenntartásában. Ezek közül számos egymással anatómiailag vagy funkcionálisan átfedő, kölcsönható rendszer is van, ami miatt az agy képes nagymértékben kompenzálni a szabályozásban résztvevő egyes struktúrák funkcionális kiesésének hatásait és ez a jelenség nagyon megnehezíti a léziós kísérletek értékelését.

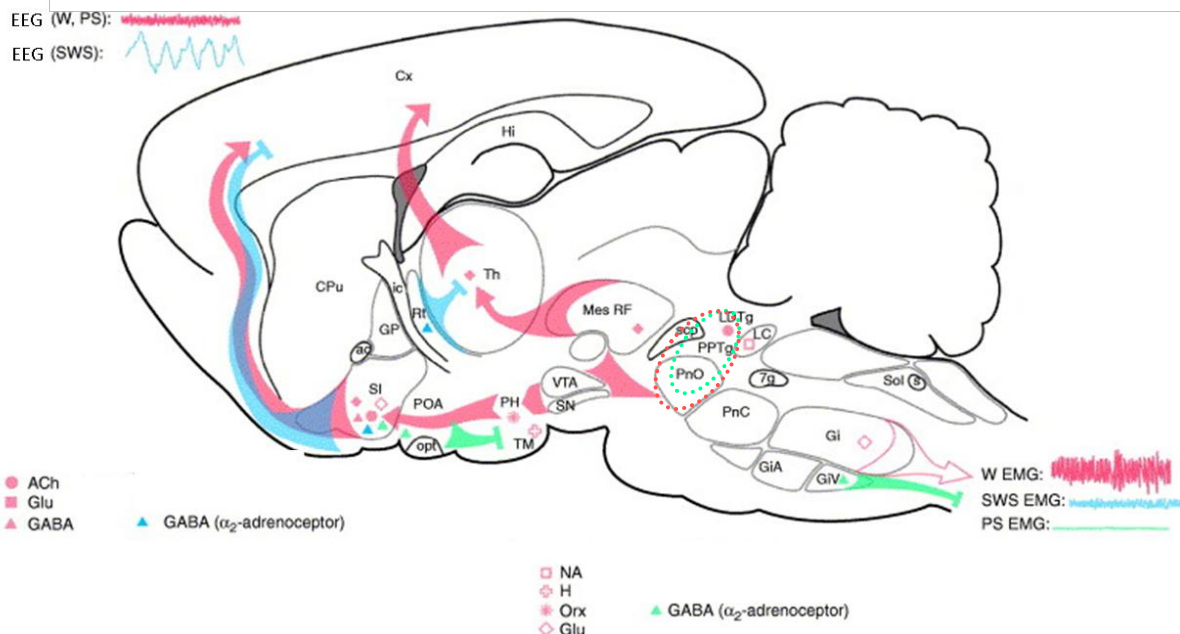
1.7 ábra folyt.: Fontos megjegyezni, hogy a mai tudásunk szerint a szinkronizáló centrum lokalizálása némileg megváltozott: a mediális PnC-t inkább mint lokomotoros és mozgás iniciátor centrumot (Lee és mts., 1996) tartjuk számon, míg a ténylegesen szinkronizáló centrum a töle medio-dorzálisan található parafacális-zónában található (Anaclet és mts., 2012). Rövidítések: BC, brachium conjunctivum; BP, brachium pontis; CP, colliculus inferior; FP, fasciculus longitudinalis medialis; LM, lemniscus medialis; MV, tractus mesencephalicus nervi trigemini; NLL, nucleus lemnisci lateralis; NP, nuclei pontis; NR, nucleus ruber; NRV, nucleus reticularis ventralis; NTR, nucleus corporis trapezoidei; OS, oliva superior; P, tractus pyramidalis; RPC, nucleus reticularis pontis caudalis; RPO, nucleus reticularis pontis oralis; SCV, tractus spinocerebellaris anterior; TD, nucleus tegmenti dorsalis; TR, corpus trapezoideum; TF, tractus tectospinalis.

(Camacho Evangelista és Reinoso Suarez, 1964)

Az idegtudomány óriási erőfeszítéseket tett annak érdekében, hogy ezeket a funkcionálisan körülírt idegsejthálózatokat neurokémiaiilag is karakterizálja. Ezek részletezése szétfeszítené e dolgozat terjedelmét, így erről csak egy elnagyolt összefoglalást tudunk adni, melyet a **1.8 ábra** mutat be, és amely azért szükséges, hogy a majd az eredmények fejezetben részletezett megállapításainkat, melyeket a hídi *formatio reticularis* bizonyos sejtcsoportjairól teszünk, a rendszer bonyolultságának tükrében tudjuk értelmezni.

Számos olyan, különböző anatómiai struktúrában elhelyezkedő, idegsejt csoport van melyek aktivitása az organizmus éppen aktuális vigilancia szintjével együtt változik. Ezek közül az ébrenlét fenntartásában a következők vesznek részt: a Locus Coeruleus (LC) noradrenerg-, a Tuberomamilláris mag (Nucleus Tuberomamillaris, TMN) hisztaminerg-, a dorzális és mediális Raphe mag (Nuclei Raphe Dorsalis et Medialis, DRN, MRN) szerotoninerg és a ventrális periaqueductalis szürkeállomány (Substantia grisea periaqueductalis ventralis, vPAG) dopaminerg sejtjei (Jones, 2003; Lu és mtsai., 2006a). Ezekre a monoaminerg rendszerhez tartozó neuronokra nagy vonalakban igaz, hogy tüzelési rátájuk az ébrenlét alatt a legmagasabb, amely aztán a NREM-alvás alatt csökkenő tendenciát mutat és a REM-alvás alatt éri el minimumát (Hobson és mtsai., 1975; Lin és mtsai., 1996; Jones, 2005). Ezen sejtcsoportokkal ellentétben az agytörzsben és a bazális előagyban elhelyezkedő, nagyszámú kolinerg idegsejt aktivitási szintjére az jellemző, hogy ébrenlétben és a REM-alvás alatt egyaránt magas tüzelési rátával rendelkeznek és aktivitásuk minimuma a NREM-alvás alatt figyelhető meg (Webster és Jones, 1988; Datta és Siwek, 2002). Közbeszúrásként itt jegyeznénk meg, hogy az imént említett kolinerg rendszer alapvető jelentőségű az '*arousal*' szabályozásában és a REM-alvás indukciójában és ezen hatásait a dolgozat fő témájaként később tárgyalandó, a PnO-ban elhelyezkedő neuronpopulációkon keresztül fejt ki (erről később még lesz szó).

A monoaminerg sejtekhez hasonló aktivitási mintázattal rendelkezik egy viszonylag későn felfedezett neuropeptiderg neuronpopuláció nevezetesen a



1.8 ábra Sematikus áttekintő ábra az alvás létrejöttében szerepet játszó NREM (kék, Slow-wave sleep, SWS) és REM (zöld, Paradoxical sleep, PS), valamint az ébresztő (telt piros: az EEG-re ható, üres piros: a viselkedési 'arousal' válasza ható) neurotranszmitter rendszerekről és hatásairól (jobbra fent és balra lent). Látható, hogy a vigilanciát és az alvást szabályozó rendszerek meglehetősen bonyolultak és egymással átfedőek. Azok közül a neuronok közül, amelyek az ébrenlétben (W) aktívak aszcendens projekciókkal hatékonyan képesek deszinkronizálni az agykérgi EEG-t (telt piros jelek és vonalak) és ezek közvetlen vagy indirekten serkentik azokat a gerincvelő-felé descendens projekcióval rendelkező, a hídi- és a nyúltvelői *formatio reticularis*-ban elhelyezkedő, neuronokat melyek biztosítják az aktív ébrenlétben szükséges izomtónust (üres jelek és vonalak). A piros üres jellel ellátott struktúrák tartalmazzak noradrenerg- (NA), a hisztaminerg- (H), az orexinerg (Orx) és glutamaterg (Glu) neuronokat, a telt piros jellel ellátott ascendáló rendszer pedig (néhány közülük REM-alvás alatt is aktívak (ld. piros és zöld szaggatott vonalak)) acetilkolinot (ACh), glutamátot (Glu) és GABA-t is használó idegsejteket is tartalmaz. Az alváskor működő idegsejtek (zöld és kék jelek és vonalak) felszálló hatásai képesek elnyomni az ébresztő hatásokat és a leszálló efferenseik viszont képesek gátolni az agytörzs különböző területein és/vagy a gerincvelőben, így módon hatékonyan tompítják a viselkedésben megnyilvánuló 'arousal'-t és/vagy az izomtónust. A lassú-hullámú (SWS) vagy NREM-alvás alatt létrejövő hiperszinkron EEG-vel pozitívan korreláló idegsejtek főképp GABA-erkek (kék háromszögek) képesek a noradrenerg és a glutamaterg serkentő hatásokat antagonizálni. A thalamikus GABA-erg idegsejtek a retikuláris magban (Rt) úgy vesznek részt a lassú-hullámú EEG kialakításában, hogy burst-ös kisüléssorozatokkal gátolják a thalamo-kortikális sejteket az alvási-orsók és hullámok alatt. A bazális előagyban és a preoptikus áréában α_2 -adrenoceptort expresszáló GABA-erg idegsejtek a descendens hatásaikkal képesek hatni a nyúltvelői atónia-központokra és így módon indirekten elősegíteni a REM és a NREM-alatt előálló izomtónus csökkenést (zöld nyilak). A nyúltvelőben elhelyezkedő GABA-erg és glicinerg neuronok pedig képesek közvetlen gátolni a gerincvelő motoneuronjait így végrehajtva a REM alatti teljes atóniát. (Folytatás ld. következő oldal.)

hypothalamusban található orexinerg, avagy hipokretinerg sejtcsoport, melynek fontos szerepe van az ébrenlét fenntartásában (de Lecea és mtsai., 1998; Peyron és mtsai., 1998). Fontos hangsúlyozni, hogy csak a fenntartásában nem pedig az indukálásában vállal szerepet azáltal, hogy rendkívül kiterjedt efferens projekcióit kihasználva képes serkenteni a PnO 'arousal'-t biztosító sejtjeit úgy, hogy a belső gátló rendszerére hat, ily módon másodlagosan fenntartja az ébrenléthez szükséges 'arousal'-hatást (Watson és mtsai., 2008; Brevig és mtsai., 2010; Saper és mtsai., 2010). Szerepe inkább az alvás-ébrenléti ciklus finomhangolásában és az 'arousal' homeosztatis (cirkadián) szabályozásában van ezért hatása lassú, elnyúló összehasonlítva az agytörzsi eredetű generalizált 'arousal' válasszal (Adamantidis és mtsai., 2007).

Látható, hogy az alvás-ébrenléti ciklus szabályozásában résztvevő bonyolult, egymással átfedő és egymást hatásait ellenpontosítani képes rendszerek finom összehangoltságban működnek. Az alvás révén tudatunkat napi rendszerességgel elveszítjük. Ahhoz, hogy ez az organizmus homeosztázisának megfelelően és szabályozottan menjen végbe, a fent részletezett szabályozó rendszerek épsége szükséges. Mivel a tudat, mint állapot meglétéhez szükséges az ARAS 'arousal'-t kiváltó szerepe a thalamo-kortikális rendszer felé, természetesen ezek a rendszerek az agykérgen kívül egymásra és a ARAS-ra is fejtenek ki hatást. AZ ARAS pedig számos efferensével képes hatni ezekre a szabályozó rendszerekre, így képes adekvátan megváltoztatni, vagy összehangolni az agykéreg funkcionális állapotait (Sukhotinsky és mtsai., 2007; Lee és Dan, 2012).

1.8 ábra folyt.: Rövidítések: 7g, n. facialis; ac, commissural anterior; CPu, caudo putamen; Cx, cortex; Gi, n. reticularis gigantocellularis; GiA, n. reticularis gigantocellular, partio α ; GiV, n. gigantocellularis, ventralis; GP, globus pallidus; Hi, hippocampus; ic, capsula internalis; LDTg, nucleus laterodorsalis tegmentalis; Mes RF, mesencephalicformatio reticularis; opt, tractus opticus ; PH, posterior hypothalamus; PnC, n. reticularis pontis caudalis ; PnO, n. reticularis pontis oralis; POA, preopticus area; PPTg, n. pedunculopontinus tegmentalis; Rt, nucleus reticularis thalami; s, tractus solitarius; scp, pedunculus superior cerebellaris; SI, substantia innominata; SN, substantia nigra; Sol, nucleus tractus solitarius; Th, thalamus; TM, nucleus tuberomammillaris; VTA, area ventralis tegmentalis

(Jones, 2005)

Ezt hatást az ARAS és a járulékos szabályozó rendszerei két fő aszcendáló rendszeren keresztül érik el: a dorzális rostok a thalamus intralamináris magjain (Intralaminar Thalamic Nuclei; ILN) szinaptizálva indirekten érik el és fejtik ki hatásukat az agykéregre, míg a ventrális ág rostjai a posterior hypothalamusban és a bazális előagy (Basal Forebrain, BF) képeznek szinapszist a hisztaminerg TMN és a kolinerg sejtekkel (Jones, 2003). Fontos ugyanakkor megjegyezni, hogy a DRN, a LC és a PnO közvetlenül is küld diffúz rostokat az egész agykéregbe (Jones, 2005) és a frontális kéregből a PnO fogad is efferens rostokat (Sukhotinsky és mtsai., 2007). A PnO thalamo-kortikális rendszerre ható afferens, aszcendáló hatásain kívül ezeknek a frontális-kéregből eredő direkt efferens rostoknak, melyeket a PnO mint az ARAS kulcsszereplője fogad, is óriási szerep jut a tudat integritásának fenntartásában (Porrino és Goldman-Rakic, 1982; Raizada és Poldrack, 2007).

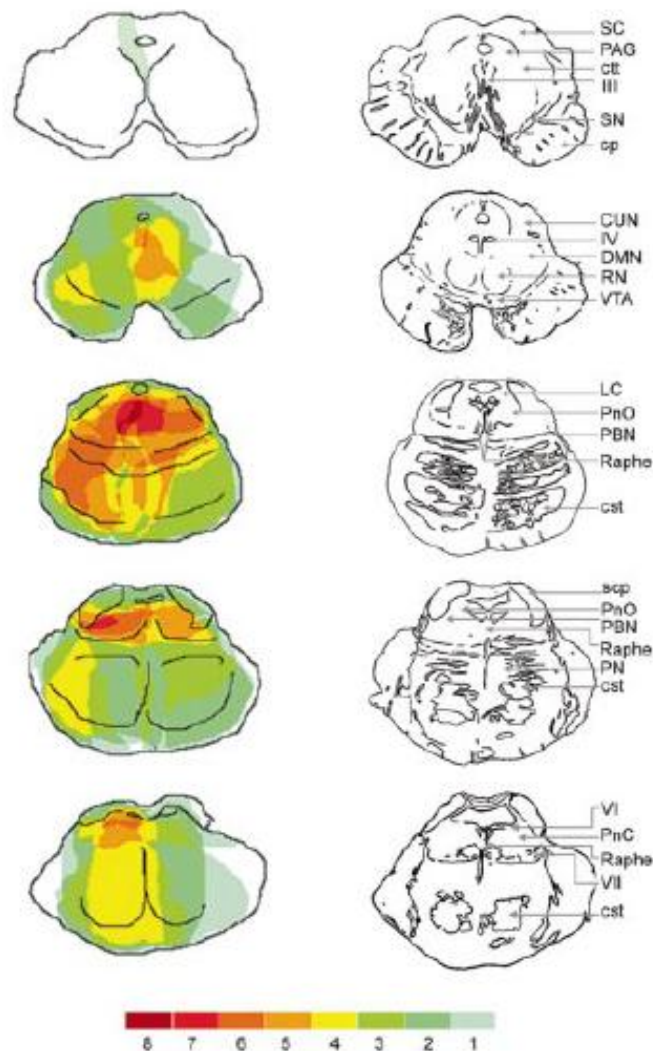
Mivel az agytörzsben vitális központok is vannak a manapság széles körben elterjedt mély agyi stimulációs technika (Deep Brain Stimulation, DBS), mellyel a MCS-ben, PVS-ben vagy kómában szenvedő betegeket próbálják gyógyítani, kénytelen csak az agytörzson kívül elhelyezkedő járulékos szabályozó rendszereket használni (Tsubokawa és mtsai., 1990; Schiff és Fins, 2007; Staunton, 2008). Ezeknek a stimulációknak a hatásai - a MRF-stimulációjához hasonlóan - csak akutan jelentkeznek az EEG-n vagy a viselkedési válaszokban, éppen ezért kell őket kúrában alkalmazni és valószínű, hogy a gyógyulásban az ARAS-ra kifejtett indirekt, trofikus hatásuk az mely perzisztensen helyreállítja a thalamo-kortikális rendszer és az agytörzs összehangoltságát (Yamamoto és mtsai., 2010). Hasonló következtetésekre vezettek azok az állatkísérletes eredmények is melyekben farmakológiailag stimulálták ezeket a rendszereket és csak rövid mikroébredéseket tudtak létrehozni a mélyen altatott állatokban, de tartósan nem tudták az ébrenlétet fenntartani. Az egyik esetben szevofluránnal altatott állat thalamusába injektáltak nikotint, a másikon pedig noradrenalin-t injektáltak a bazális előagy Meynert-féle magjába (Nucleus Basalis of Meynert, MNB) dezflurán anesztéziában (Alkire és mtsai., 2007; Pillay és mtsai., 2011).

A fejezetben részletezett összetett endogén alvás rendszeren, mivel hatékonyan fejt ki 'arousal'-t vagy ellensúlyozza, befolyásolja azt, természetesen a különböző anesztetikumok is fejtenek ki hatást (Franks, 2008; Lu és mtsai., 2008). A generális anesztézia állapota azonban minőségileg különbözik az alvástól és nem állítjuk azt, hogy csupán az ARAS és járulékos rendszereinek szelektív altatásával elérhető a mély altatott állapot, de számos fiziológiai komponensének (pl.: lassú-hullámú EEG, atonia, areflexia stb.) létrehozásában érintettek. Sok anesztetikum e rendszer különböző pontjain hatva éri el egyebek mellet például az immobilizációt, analgéziát vagy az antinocicepciót (Franks és Lieb, 1994; Brown és mtsai., 2010). A számos ellentmondásos, félrevezető eredményt is hozott lokális-intracerebrális anesztézia kutatása szolgált olyan, rendkívül fontos eredménnyel, melyről mindenképpen meg kell emlékeznünk. Abban az esetben, ha bilaterálisan injektáltak barbiturátot (GABA-agonista) az állatok PnO-jába vagy a tőle dorzálisan elhelyezkedő területekre, akkor az állatok a mély anesztéziára jellemző reverzibilis komatikus állapotba kerültek lassú-hullámú EEG-vel és atóniával (Devor és Zalkind, 2001). A hatékony lókuszt területét, mely teljességgel tartalmazza a PnO-t, úgy vezették be az irodalomba, mint középagyi-tegmentális anesztézia área (Mesopontine Tegmental Anesthesia Area, MPTA), mely képes vezérelni a váltást az aktív ébrenlét és a tudatosság elvesztése között.

Azt, hogy az agytörzsi ARAS magjai közül a PnO ép fiziológiás működése elengedhetetlenül szükséges a tudat integritásának meglétéhez, humán MRI kísérletek is megerősítették. Parvizi és Damasio agytörzsi stroke vagy egyéb agytörzsi sérülés következtében kómába esett pacienseken vizsgálta meg *post mortem* MRI-vel, hogy pontosan melyik területet érintett a sérülés (Parvizi és Damasio, 2003b). Eredményeik összesítéséből kiderült, hogy a PnO-t érintette sérülés minden kómás agyában összehasonlítva a nem kómások egyéb agytörzsi magjait ért sérüléseivel (**1.9 ábra**).

Kijelenthetjük tehát, hogy az ARAS aszcendáló aktivációs hatásaihoz egy összetett rendszer szabályozása és közvetítése járul hozzá, ugyanakkor az

agykéreghez kötött tudatosság meglétéhez az ARAS-en belül a PnO épsége esszenciális.



1.9 ábra Nyolc kómas agyában levő léziók egymást átfedő területei.

(Id. alul szinkód: a piros régiók fednek mint a 8 esetben) Jól látható, hogy a PnO a legérintetebb area. Rövidítések: cp: cerebral pedunculus; cst: tractus corticospinalis; CUN: nucleus cuneiformis; DMN: deep mesencephalic nucleus; III: nucleus oculomotorius; IV: nucleus trochlearis; PnC: nucleus reticularis pontis caudalis; PnO: nucleus reticularis pontis oralis; RN: nucleus ruber; scp: pedunculus superior cerebellaris; SN: substantia nigra; VI: nucleus abducens; VII: nucleus facialis; VTA: ventral tegmental area

(Parvizi és Damasio, 2003b)

1.4 AZ ARAS ANATÓMIÁJA ÉS FIZIOLÓGIÁJA

Az agytörzsi *formatio reticularis* magjainak elnevezése a különböző emlősfajok között nem egységes. Például macskákban az ún. óriássejtes tegmentális mező (Pontine Tegmental Field, FTG) a patkány PnC-jének feleltethető meg. Az is előfordul, hogy a patkányban felületesen elnevezett ún. mediális hídi *formatio reticularis*-on (Medial Pontine Reticular Formation, mPRF) valójában a PnO-t értik. Mivel patkányban és az emberben a nevezéktan egységesen használt, mi is ezt fogjuk követni az egyszerűség kedvéért és ha szükséges külön kitérünk a terminológiák egységesítésére.

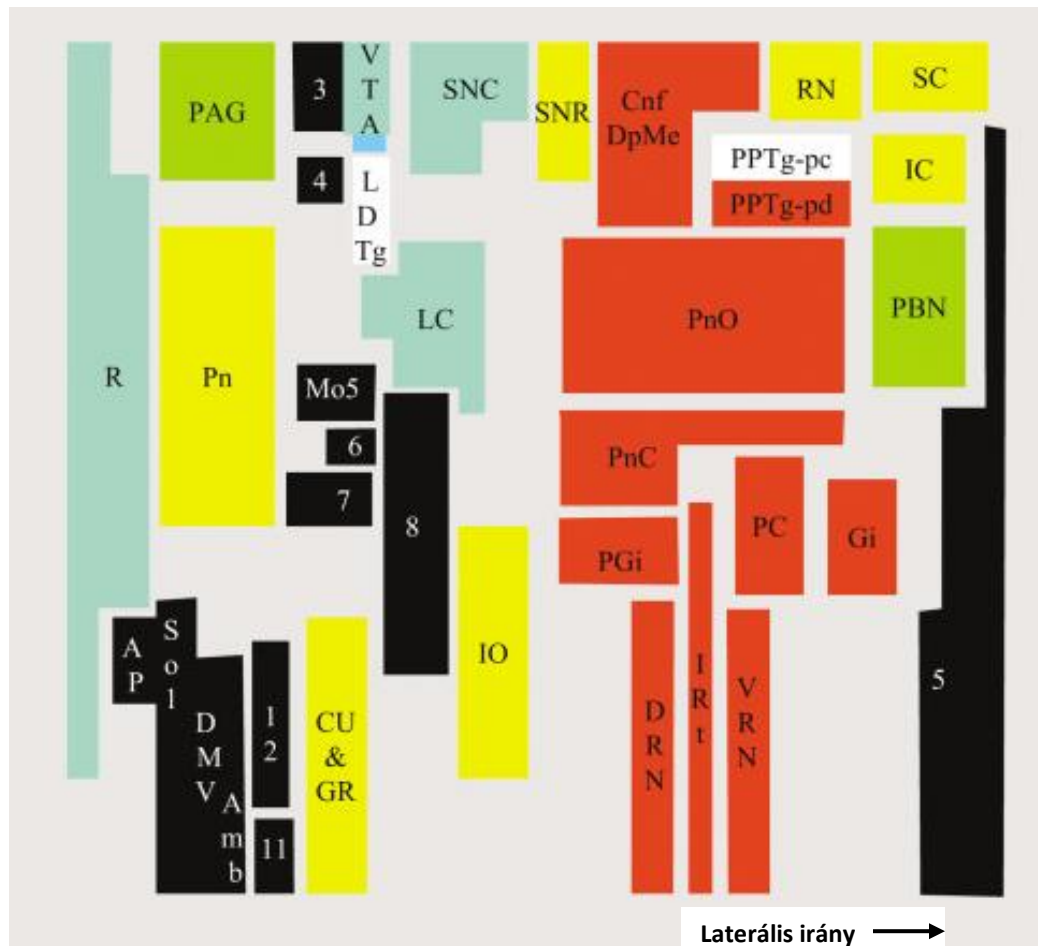
1.4.1 A *formatio reticularis* állományának elhelyezkedése az agytörzs szürkeállományában

Az agytörzs szürkeállománya különböző magokra oszlik, melyeket a következőképpen kategorizálhatunk (**1.10 ábra**):

Az **agyidegmagvak** a szenzoros, motoros és viscerális/nociceptív rostok a koponyába belépve az agytörzsben elszórtan, de sejtsűrűségüket tekintve kompakt magokat hoznak létre.

A **klasszikus retikuláris magok** az agytörzs központi régiójában a középvonaltól kissé laterálisan húzódnak végig a középagytól egészen a nyúltvelőig. Funkcionális anatómiai értelemben ezek a magok az ARAS hordozói. Állományuk viszonylag sejtszegény, de egymással átfedő régiókból áll melyekben a magok határai elmosódottak, emiatt anatómiailag valójában egyetlen egységnek tekinthetők. A klasszikus retikuláris magokon húzódik végig az óriás sejtes állomány, melynek poligonális alakú glutamáterg projekciós sejtjei sugallták a hálózatos állomány, azaz a *formatio reticularis* elnevezést (Brodal, 1964; Fremeau és mtsai., 2001; Fremeau és mtsai., 2004) (ld.: **1.11 ábra**). Ezek a sejtek küldik felszálló rostjaikat többek között a kéreg, a bazális előagy és a thalamus felé (Bernard és mtsai., 1990; Villanueva és mtsai., 1998), melyekkel közvetlen és/vagy indirekten képesek generális EEG deszinkronizációt indukálni az agykérgen. Fontos megjegyezni azonban, hogy létezik egy olyan trend a

klasszikus retikuláris magokban, hogy mennél rostrálisabb helyzetben vannak az említett projekciós sejtek, annál több közvetlen vagy átkapcsolt aszcendáló rostot projektálnak az agykéreg felé és fordítva: az egyre kaudálisabban elhelyezkedő sejtek egyre több leszálló rostot küldenek a gerincvelőbe (Steriade és mtsai., 1988; Royce és mtsai., 1991; Sukhotinsky és mtsai., 2005).



1.10 ábra Az ARAS (klasszikus retikuláris magok) elhelyezkedése (piros) az agytörzs heterogén szürkeállományában. Az ábra az agytörzsnek az egyik oldalán elhelyezkedő idegmagvakat ábrázolja sematizálva. Az ábra az áttikentetőségre törekszik, így a magok elhelyezkedése "szétterítve", de az egymáshoz viszonyított részarányosságukat megtartva ábrázolt: feketével az agyidegmagvak, pirossal a *formatio reticularis* klasszikus magvai (ARAS), kézzel a monoaminerg magok, fehérrel a kolinerg magok, zölddel az autonóm funkciók ellátásában szerepet játszó magok és sárgával az egyéb agytörzsi magok jelöltek. Rövidítések: 3: n. oculomotorius; 4: n. trochlearis; 5m: n. trigeminalis motorius; 5s: n. trigeminalis sensorius (folytatás ld.: következő oldal).

Ez a gigantocelluláris rendszer egymással mind anatómiailag, mind funkcionálisan összekapcsolt (Scheibel és mtsai., 1955; Ito és McCarley, 1987; McCarley és mtsai., 1987). Klasszikus hisztológiai technikákkal azt is sikerült kimutatni, hogy az óriás sejtek között, melyek átmérője 40-től akár 100 µm-ig is terjedhet, közepes és kis sejttestű neuronok keverednek (Mitani és mtsai., 1988b, c; Steriade és McCarley, 1990; Liang és Marks, 2009).

A klasszikus retikuláris magok a következők (**1.10 ábra** piros mezők): Nucleus Cuneiforme, (CnF); Nucleus Mesencephalicus ('Deep Mesencephalic Nucleus', DpMe); Nucleus Pedunculo pontinus Tegmentalis (pars dissipatus), (PPTg-pd), mely a PPT nem kolinerg sejtjeit tartalmazza; Nucleus Reticularis Pontis Oralis, (PnO); Nucleus Reticularis Pontis Caudalis, (PnC); Nucleus Reticularis Gigantocellularis, (Gi); Nucleus Reticularis Perigigantocellularis, (pGi), Nuclei Reticularis Ventralis et Dorsalis, (VRN és DRN) és a Zona Reticularis Intermedialis, (IRt).

A **monoaminerg magvak**hoz tartozik a noradrenerg Locus Coeruleus (LC), a szerotoninergerg ún. Raphe-komplex (az **1.10-es ábrán** PAG-ként jelölt) valamint a dopaminerg sejteket tartalmazó Substantia Nigra Pars Compacta (SNC) és az Area Tegmentalis Ventralis (VTA). Ahogy már megemlítettük ezek azok a

1.10 ábra folyt.: 6: n. abducens; 7: n. facialis; 8: n. vestibulochoclearis; 12: n. hypoglossus; Amb: ambiguus; AP: area postrema; CU és GR: n. cuneatus and gracilis; CnF/DpME: n. cuneiformis és n. mesencephalicus; DMV: n.i dorsalis motorius vagii DRN: n. dorsalis medullaris reticularis és subnucleus reticularis dorsalis 3: n. Edinger-Westphal; Gi: n. Reticularis gigantocellularis; IC: inferior colliculus; IRt: n. reticularis intermediatus; LC: locus coeruleus; LDTg: n. laterodorsalis tegmentalis; NTS: nucleus tractus solitarius; IO: oliva; PAG: grisea periaqueductalis ; PBN: n. parabrachialis; PC: n. r. parvocellularis; pGi: n. r. paragigantocellularis; PnC: n. r. pontis caudalis; PnO: n. r. pontis oralis; PPTg-pc: n. pedunculo pontinus tegmentalis (pars compacta); PPTg-pd: nucleus pedunculo pontinus tegmentalis (pars dissipatus); RN: n. ruber; SCol: superior colliculus; SNC: substantia nigra pars compacta, SNR: substantia nigra pars reticulata; and VRN: n. ventralis reticularis ; VTA : area tegmentalis ventralis

(Parvizi és Damasio, 2003a)

magok, melyek az ARAS-en kívül küldenek direkt rostokat is az agykéregbe (Moore és Bloom, 1979) és fogadnak rostokat az ARAS-tól (Aston-Jones és mtsai., 1986; Van Bockstaele és Aston-Jones, 1992). Ezeknek a monoaminerg magoknak a szerepe a viselkedés szabályozásában olyan szerteágazó és annyira kutatott, hogy ismertetésére ebben a dolgozatban nem vállalkozhatunk, de meg kell említenünk, hogy a ARAS generalizált aktivációját - szervező hatásaik révén - olyan specifikus, magasabb kognitív tartalmakkal egészítik ki, mint például a motiváció, figyelem, memória vagy a jutalmazási mechanizmusok (Sara, 2009; Varga és mtsai., 2009; Fujisawa és Buzsaki, 2011).

A **kolinerg magok** közé a Nucleus Laterodorsalis Tegmentalis (LDTg) és a Nucleus Pedunculopontinus Tegmentalis pars compacta (PPTg-pc) tartozik, melyben a PPT kolinerg magjai csoportosulnak (Kanai és Szerb, 1965; Mesulam és mtsai., 1989). Ezeknek a kolinerg magoknak a fő projekciós területe a thalamus, különösen annak a retikuláris magja (Nucleus Reticularis Thalami, nRt), mely a thalamus gátló rendszerét tartalmazza (Pare és mtsai., 1988) és a bazális előagy Meynert féle magja (Nucleus Basalis Meynerti, NBM) (Semba és mtsai., 1988; Muller és mtsai., 1993). A nRt a gátló rostjaival képes a thalamus többi magjában levő thalamo-kortikális sejteket ritmikusan gátolni, ezáltal létrehozni az ún. thalamikus orsó oszcillációkat a lassú-hullámú alvás alatt (Steriade és Deschenes, 1984; Steriade és mtsai., 1993). A kolinerg magok felszálló hatásaikkal képesek blokkolni az EEG-n megjelenő orsók kialakulását és e hatásuk révén indirekten hozzájárulni az agykéreg éberségre jellemző, arousabilis állapotához (Szerb, 1967; Steriade, 1993; Lee és Dan, 2012). Azt, hogy az '*arousal*' fenntartásában ezeknek a kolinerg sejteknek fontos szerep jut, sikerült igazolni extracelluláris egysejtaktivitások elvezetésével altatott (Balatoni és Detari, 2003), éber fejbefogott (Kayama és mtsai., 1992) és szabadonmozgó állatokban is (Datta és Siwek, 2002), azonban számos kísérlet igazolta, hogy a NBM-ben elhelyezkedő kolinerg sejtek hatása még alapvetőbb az agykéreg aktivációjának fenntartásában (Buzsaki és mtsai., 1988).

A kolinerg magvak másik fő projekciós területe az ARAS-ban elhelyezkedő kolinoceptív terület, mely a ventrális PnO-t (vPnO) és a PnO/PnC határzónáját

foglalja magába (ld.: **1.8 ábra** piros és zöld szaggatott körök), mely macskában ekvivalens a mediális óriássejtes tegmentális mezővel (mFTG) (Woolf és Butcher, 1989; Rodrigo-Angulo és mtsai., 2005). Az itt elhelyezkedő óriás glutamaterg sejtek axonjaikat bipolárisan eresztik ki, így egyaránt képesek adni felszálló és leszálló kollaterálisokat is, melyekkel a kolinerg aktiváció hatására paralel hozzák létre a REM-alvás két fő attribútumát a θ -dominált EEG-t és az atóniát (ld.: **1.11 ábra A**) (Scheibel és Scheibel, 1960; Nunez és mtsai., 1997). Michel Jouvét klasszikus átvágásos kísérletei révén indirekten már korán bizonyított volt a kolinerg magok szerepe a REM-alvás indukciójában (Jouvét és Michel, 1960a; Jouvét, 1969), mely szerepet később fiziológiai bizonyítékokkal is alátámasztottak (Steriade és mtsai., 1982; Rasmusson és mtsai., 1994; Datta és Siwek, 1997, 2002). Az, hogy REM indukciós hatásukat a vPnO és a PnO/PnC határán elhelyezkedő óriás sejtes állományon keresztül fejtik ki úgy bizonyosodott be, hogy ha carbacholt (kolinerg agonista) injektáltak ezekbe a kolinoreceptív zónákba, akkor a fiziológiás REM-alvásnak megfelelő állapotba kerültek az állatok (Amatruda és mtsai., 1975; Silberman és mtsai., 1980; Baghdoyan és mtsai., 1984; Yamamoto és mtsai., 1990b, a). Ez a hatás érdekes módon gyorsabban kialakult, ha közvetlenül ezekbe a területekbe injektálták a kolinomimetikumot, mintha magukba a kolinerg magokba injektálták volna (Baghdoyan és mtsai., 1987; Garzon és mtsai., 1998). Mikroelektrofiziológiai módszerekkel sikerült igazolni, hogy a kolinerg „REM-on” sejtek effektorai ezek az óriás sejtek (Shiromani és McGinty, 1986; Garcia-Rill és mtsai., 2001; Ito és mtsai., 2002). Számos eredmény enged következtetni arra, hogy ez a kolinerg hatást a PnO lokális GABA-erg interneuronjai indirekten mediálják az óriás glutamaterg sejtek felé (Xi és mtsai., 1999b, a, 2004; Watson és mtsai., 2011), azonban ennek a direkt elektrofiziológiai bizonyítása azonban még várat magára.

A REM-alvás az alvás-ébrenléti ciklus egyik legkevésbé megértett állapota, ugyanis közismerten az agykérgi EEG és a hippocampális lokális mezőpotenciálok (Local Field Potential, LFP) aktív állapotához teljes motoros atónia társul. Emiatt a látszólagos paradoxon miatt nevezte Jouvét a REM-alvást „paradox”-alvásnak (Jouvét és mtsai., 1959; Jouvét és Michel, 1960c, b). A

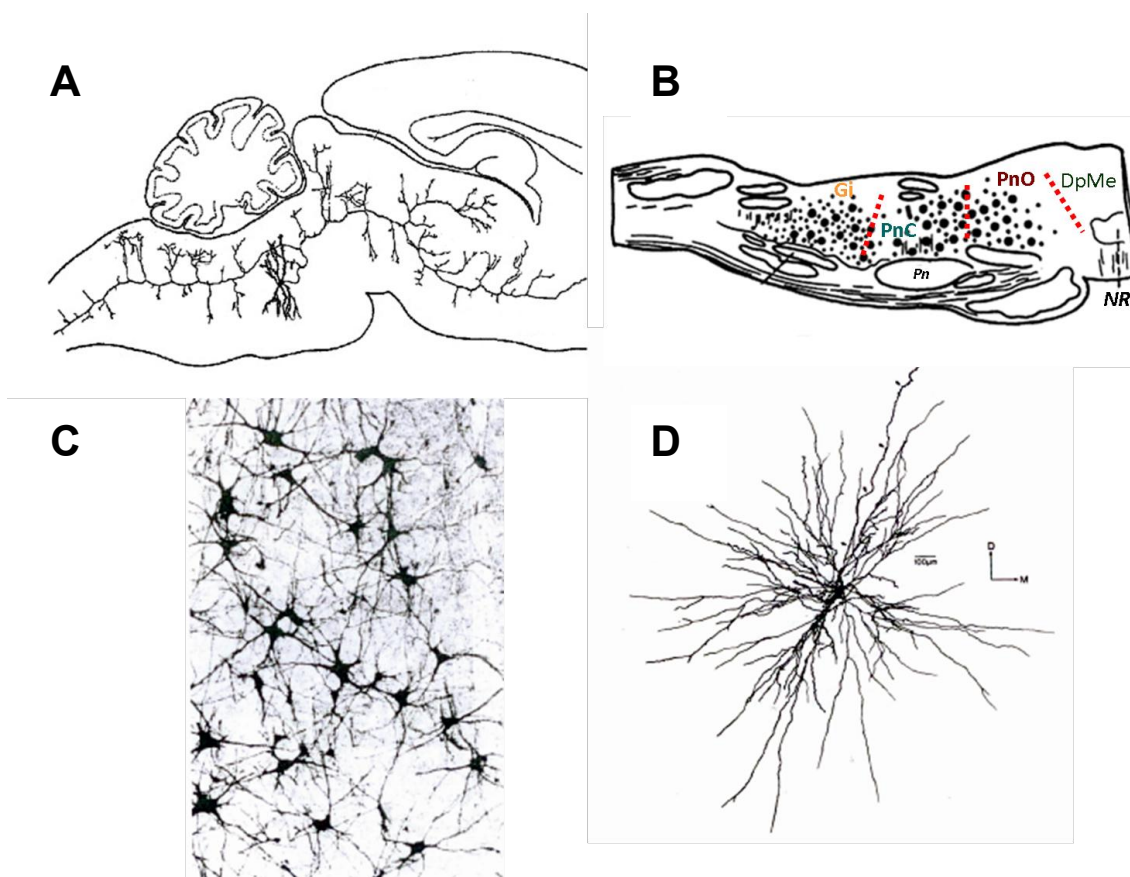
kolinoceptív zóna sejtjeinek - már említett - anatómiája és kapcsolatai részben megmagyarázzák a REM-alvás kettős természetét, azonban meg kell jegyezni, hogy szinte mindegyik transzmitter rendszer, melyeket előzőleg már említettünk részt vesz a REM-alvás rendkívül bonyolult szabályozásában (ld.: **1.8 ábra**) (Sastre és mtsai., 1996; Lu és mtsai., 2002). Ezeket az afferens szabályozó hatásokat feltehetőleg az ARAS-ben elhelyezkedő lokális interneuronok integrálják. Az ARAS klasszikus magjain kívül eső „REM-on” és „REM-off” sejtek, azokkal a GABA-erg sejtekkel, melyek körülveszik az óriás effektor neuronokat, reciprok kapcsolatban állnak és ezeken - a feltehetőleg diszinhibitorikus kapcsolatokon - keresztül történik az átmenet a NREM- és a REM-alvás között (Lu és mtsai., 2006b; Luppi és mtsai., 2006; Fuller és mtsai., 2007).

Az **autonóm-funkciójú magok**hoz tartozik a Nucleus Parabrachialis (PBN) és a centrális szürkeállomány (PAG) nem szerotoninerg része. Eleinte ezekről a magokról úgy gondolták, hogy a szervezet belső homeosztázisának fenntartását biztosítják (Grastyan és mtsai., 1952; Grastyan és mtsai., 1956; Tigyi és mtsai., 1960), azonban ma már a szerepükről alkotott tudás megváltozóban van, ugyanis kiderült, hogy párhuzamosan az ARAS rostjaival ők is küldenek számos aszcendens rostot az agykéreg és/vagy a vele összekapcsolt területek felé, melyek révén hozzájárulnak az agykéreg aktivációjához (Pare és mtsai., 1988; Bester és mtsai., 1999; Fuller és mtsai., 2011). Fontos megjegyeznünk, hogy ezeknek a magoknak integráló szerepet a Lissák Kálmán (1908-1982) és Grastyán Endre (1924-1988) nevével fémjelzett pécsi élettani iskola tulajdonított. Kimutatták, hogy az említett magok a felszálló viszceralis idegi impulzusokat az állat homeosztatisz állapótától függően vagy blokkolják, vagy továbbítják az ARAS és/vagy az agykéreg felé (Grastyan és mtsai., 1952; Grastyan és mtsai., 1956; Endroczi és mtsai., 1967; Kovacs és mtsai., 1976).

Az eddig nem részletezett **egyéb magok** funkciót, mivel a dolgozat tárgyához szorosan nem kapcsolódnak, most nem részletezzük. Ezekhez tartoznak többek között a kollikuluszok, az oliva (OI) magjai, a kisagymagvak, a hídi magvak (Pontine Nuclei, Pn), a Nucleus Gracilis et Cuneatus (CU és GR) és a vörös-mag (Nucleus Ruber, RN) (ld.: **1.10 ábra**).

1.4.2 Az ARAS sejtjeinek morfológiája és fiziológiája

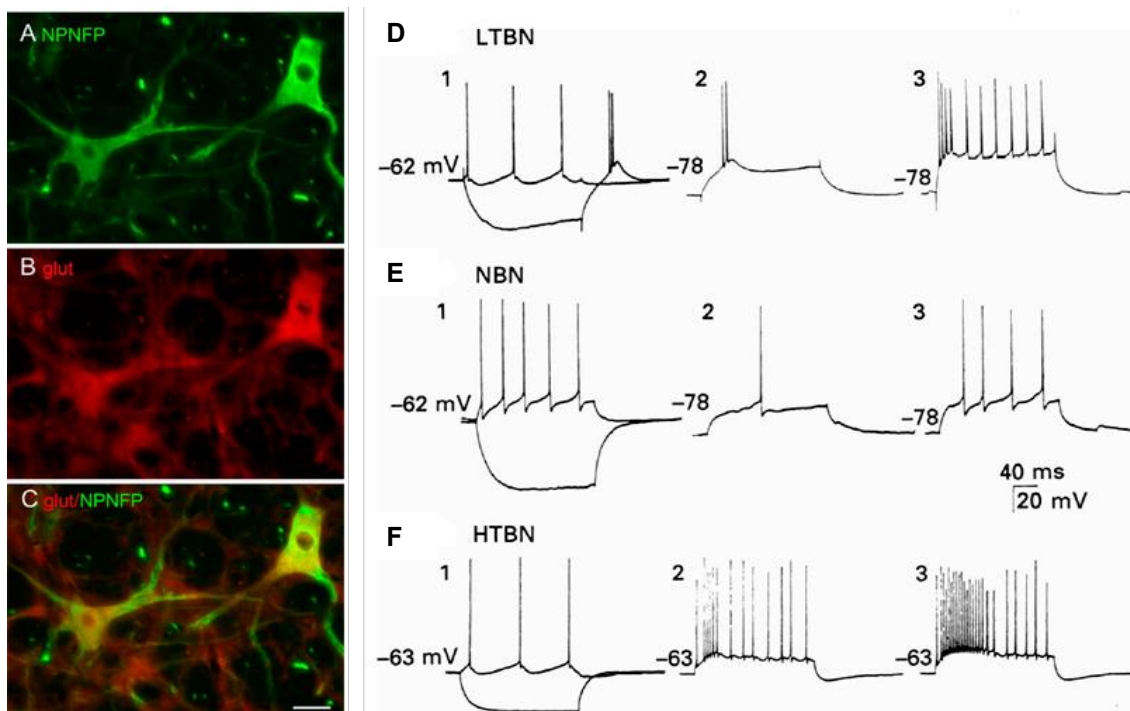
Összehasonlítva más agyterületek sejtjes állományával a *formatio reticularis* klasszikus magjaiban helyet foglaló sejtek rendkívül nagy heterogenitást mutatnak, mind méretüket, mind pedig morfológiájukat tekintve. A középagy *formatio reticularis* (DpMe) magtól, a hídi ARAS magokon (PnO, PnC) keresztül, egészen a nyúltvelői gigantocelluláris mezőig (Gi) terül el ez a diffúz állományú sejt-tömeg (1.11 ábra B), melyben a Golgi-féle impregnációs technikával festődő óriás sejtek elrendeződését hálózatosnak ('retikuláris') írtak le és úgy klasszifikáltak, mint *formatio reticularis* (1.11 ábra C) (Lenhossék, 1855; von Kölliker, 1867; Valverde, 1961b).



1.11 ábra A *formatio reticularis* “hálózatos” sejtjei (A) Egy a PnO/PnC határán elhelyezkedő neuronból, melynek bipoláris axonja elágazva egyszerre ad leszálló és felszálló rostot is (Scheibel és Scheibel, 1958). (B) A klasszikus retikuláris magokban elhelyezkedő gigantocelluláris állomány (nagyobb körök), mely kisebb számú sejtekkel keveredik (Hobson és Steriade, 1986) (Kis körök). (C) A nagy sejtek alkotta hálózat Golgi-féle ezüstözéssel kimutatva. (Scheibel és Scheibel, 1958). (D) Egy óriás sejt morfológiája (nyílak: axon) (Mitani és mts., 1988c).

A klasszikus magokban elhelyezkedő idegsejtek szóma mérete tág határok között változik: vannak kis (átlag átmérő (ÁÁ) $<20\ \mu\text{m}$), közepes (ÁÁ $<40\ \mu\text{m}$), nagy (ÁÁ $<60\ \mu\text{m}$) és óriás (ÁÁ $>60\ \mu\text{m}$) sejttest átmérőjű sejtek is (Scheibel és Scheibel, 1958; Valverde, 1961a, b, 1962). Ehhez az SEjtméretbeli heterogenitáshoz járul még hozzá az, hogy a sejtek nem alkotnak körülírható magokat, hanem a fel és leszálló rostok tömegei között elszórtan alkotnak egy diffúz állományt. Összehasonlítva más struktúrákkal a *formatio reticuláris* fiziológiai vizsgálata emiatt különösen nehéznek számít, mégis azt lehet mondani, hogy másokon kívül Mircea Steriade (1924-2006), Robert McCarley (1937-) és Allen Hobson (1933-) életműve nyomán mikroelektrofiziológiailag jobban feltárt, mint anatómiailag. Steriade csoportjával leginkább a középagyi *formatio reticularis* (MRF, DpMe) thalamusra és kéregre kifejtett hatásait tisztázta, míg McCarley és Hobson munkatársaival a kolinoceptív területek elektrofiziológiai karakterizálását végezte el az alvás-ébrenléti ciklus alatt. Mindannyian fejbefogott macskákon elvégzett kísérletekből vonták le következtetéseiket melyekből két olyan gigantikus, összefoglaló munka is született melyek mélyebb betekintést nyújtanak az ARAS klasszikus fiziológiájába: '*Brainstem Control of Wakefulness and Sleep*' (Steriade és McCarley, 1990), '*Neuronal Basis of Behavioral State Control*' (Hobson és Steriade, 1986).

In vitro környezetben McCarley munkacsoportjával a PnO/PnC határán és a PnC állományában olyan idegsejteket mutatott ki, amelyek speciális alacsony-küszöbű (Low-Threshold Burst Neuron, LTBN) és kalcium-függő akciós potenciálokkal (AP) rendelkeztek (**1.12 ábra D**) (Greene és mtsai., 1986). Ez az akciós potenciál ('spike') inaktíválódott, ha a membrán-potenciál (MP) relatívan depolarizálttá vált, viszont az ún. deinaktiváció után képes volt sorozattüzeléses ('burst') módba váltani. Később intracelluláris elvezetésekkel sikerült az említett LTBN neuronokon kívül, másik két típust is azonosítani. Az egyik csoport a nem sorozattüzelő neuronokból (Non-Burst Neuron, NBN) (**1.12 ábra E**), a másik pedig magas-küszöbű sorozattüzelő neuronokból állt (High-Threshold Bursting Neuron, HTBN) (**1.12 ábra F**) (Gerber és mtsai., 1989).



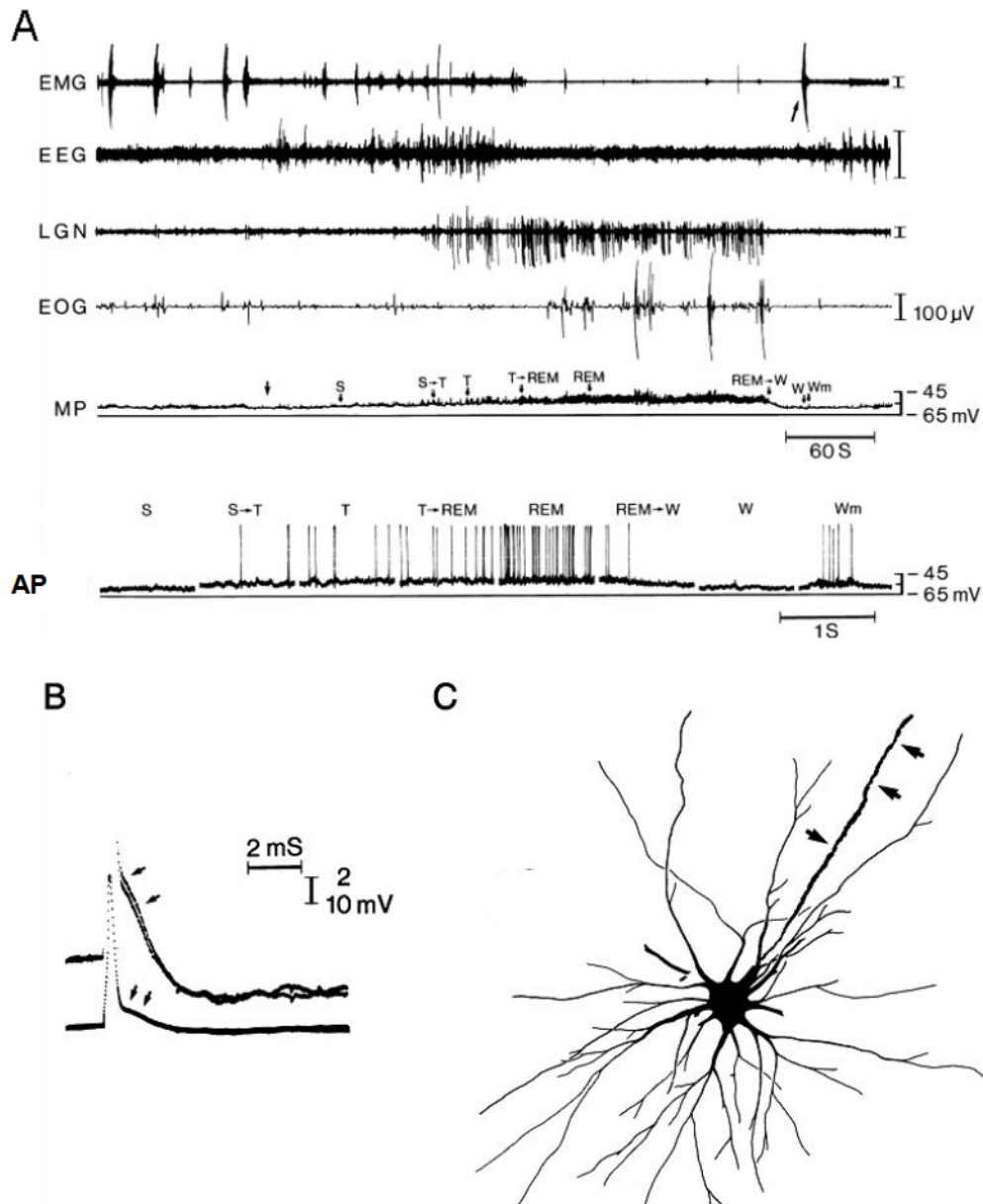
1.12 ábra A PnO/PnC neuronjainak három csoportja a belső tüzelési sajátosságaik alapján (D). Közülük az LTBN neuronok rendelkeznek óriás glutamáterg sejttesttel (A, B és C). (A és B) Az óriás neuronokban jelen levő ún. nem-foszforilálható neurofilamentális fehérje (Nonphosphorylated Neurofilament Protein, NPNFP) ellen termeltetett, zöld fluoreszcens ellenanyag, valamint a vezikuláris glutamát transzporterre (glut) kötő pirosan fluorészáló ellenanyag, az óriás sejteket szelektíven kirajzolja. (C) A NPNFP és a glut kolokalizál egymással (Baizer, 2009). Calib.: 100µm. (D1) Az LTBN sejtek egy alacsony küszöbű burst-ös (depolarizáló injektált áram pulzus: 200 pA, 200 ms) és nem burst-ös működése (hiperpolarizáló injektált áram: 400 pA, 200ms). (D2 és 3) Burst válasz a 200 és 300 pA-es depolarizáló áramra és nem burst-ös válasz az 500 pA -es áramra (hiperpolarizált MP). (E1) Egy NBN neuronokban a burst válasz elmarad a deinaktiváció után (200 pA depolarizáló pulzus után 400 pA hiperpolarizáló pulzus-t injektáltak). (E2 és 3) 300 és 500 pA-es depolarizáló áramra adott késleltetett válaszok. (F1) Nem képes sem a 200 pA depolarizáló, sem a 600 pA hiperpolarizáló pulzus burst-öt kiváltani. (F2 és 3) Magasabb amplitudójú depolarizáló pulzusok ugyanakkor burst-öt generáltak, mely burst-öket egy nem burst-ös szakasz követ (Gerber és mts., 1989).

(Gerber és mts., 1989), (Baizer, 2009)

Az elvezetett sejteket a regisztráció után karboxi-fluoreszcinnel töltötték fel (Gerber és mtsai., 1989) és kiderült, hogy az LTBN idegsejtek rendelkeztek a nagyobb, glutamáterg szómákkal (ÁÁ>35µm) (Fremeau és mtsai., 2001; Fremeau és mtsai., 2004; Brunelli és mtsai., 2005; Baizer, 2009).

Fejbefogott, éber macskákban sikerült kimutatni, hogy vannak olyan sejtek a hídi *formatio reticularis*-ban, amelyek az alvás-ciklus alatt úgyv változtatják meg MP értéküket, hogy a lassú-hullámú alvásból REM-avásba, vagy ébrenlétbe való belépés előtt megemelik azt (Ito és McCarley, 1984). Mivel ezeknek a kalciumfüggő burst-öknek a megjelenése függött a MP értékétől a LTBN neuronokban *in vitro*, McCarley azt feltételezte, hogy ezek a sejtek váltanak burst-ös üzemmódba a REM-alvás alatt (Greene és mtsai., 1986). Ahhoz, hogy feltételezését bizonyítsa fejbefogott macskákból egyszerre vezette el intracellulárisan az akciós potenciálokat és az adott sejt MP-ját, majd a regisztráció után biocitinnel és Texas Red-del töltötte fel az adott sejtet (Ito és mtsai., 2002). Kísérleteiben bebizonyosodott, hogy mennél nagyobb a sejt mérete (ÁÁ= 60-100 μm , átlag felület= 3073 μm^2 - 5958 μm^2), annál előbb depolarizálódik a MP-ja a REM alvásba jutás előtt, míg a kisebb és közepes neuronoknak nem volt szükségük a MP ilyenfajta „inkubációjára” (**1.13 ábra**). Általánosan igaz a nagy sejtekre, hogy már jóval a lassú-hullámú alvásból a REM-alvásba való átmenet előtt depolarizálódott a MP-juk és ha ebben elérték egy kritikus szintet, akkor jelentek meg akciós potenciáljaik (AP). Az az időszakasz, mely a MP emelkedésétől az AP-ok megjelenésig tartott egyenes arányban változott a sejtek méretével. Ugyan fejbefogott macskákban nehéz ébrenlét alatt intracellulárisan elvezetni, ebben a munkában mégis sikerült és kiderült, hogy a REM-alvás előtt a nagy sejtek MP-ja konstansan depolarizált állapotban kell, hogy legyen ahhoz, hogy tüzelni kezdjenek, ellenben ébrenlétben az AP sorozatok megjelenéséhez a MP még negatívabb fázikus depolarizációja járul (**1.13 ábra**). A lassú hullámú alvásból ébrenlétbe való váltáskor nincs szükség a nagy sejtek MP-jának inkubálódására, hanem azonnal tüzelni kezdenek a REM-alváshoz hasonló rátával. Az feltételezhető, hogy az óriás sejteken a REM-alvás előtti tartósan magas MP fenntartását egy intraretikuláris potenciórozó 'feed-back' mechanizmus biztosítja, mely a körülöttük levő közepes (ÁÁ~ 40 μm) sejtek biztosítanak úgy, hogy megerősítik és fenntartják a PPT-ből és az LDT-ből érkező kolinerg REM indukciós hatást (Mitani és mtsai., 1988d; Ito

és mtsai., 2002). Ez jól egybeesik a megfigyeléssel, hogy a NREM-REM váltás nem éles, hanem egy átmeneti szakasz jellemzi.



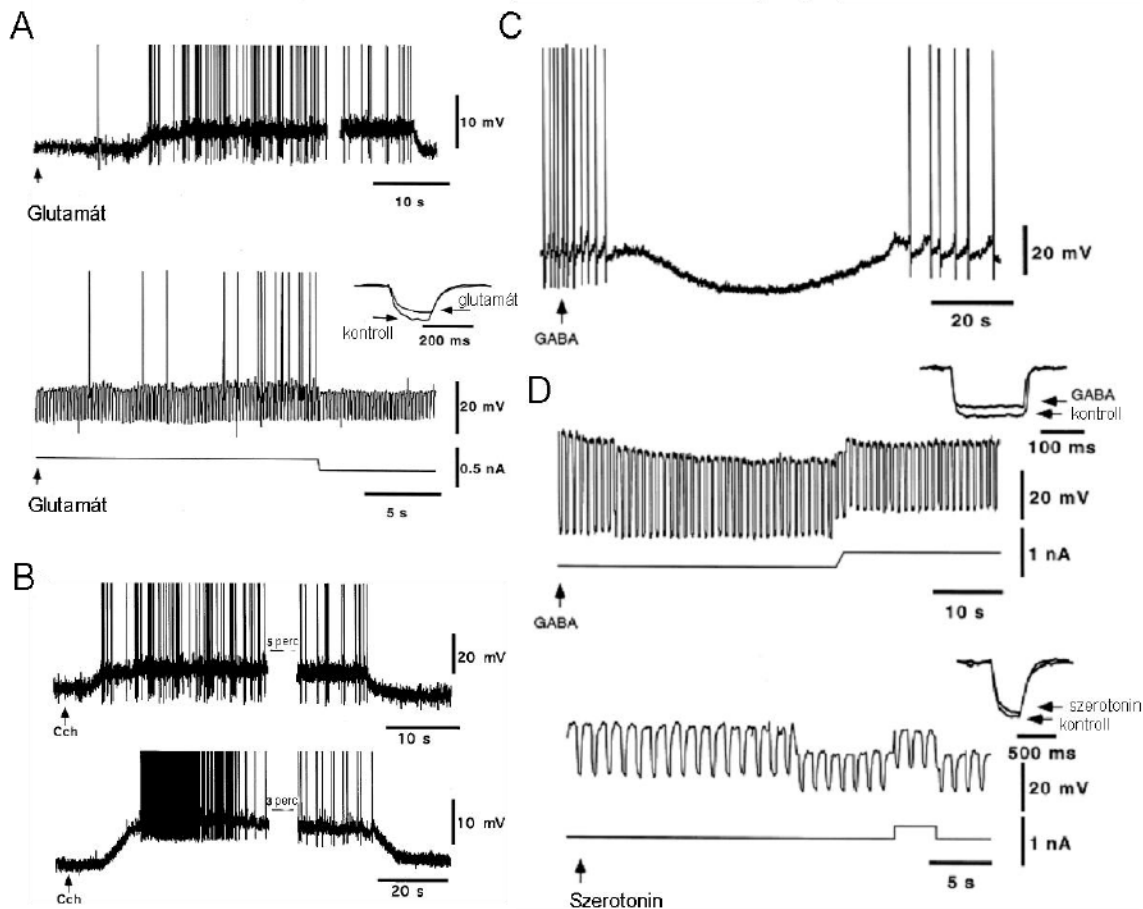
1.13 ábra Az óriás sejtek membránpotenciáljának és akcióspotenciáljainak változásai az alvás ébrenléti ciklus alatt.

(A) Poligráfias görbék ciklus alatt. Az alsó két görbe mutatja a MP megváltozását. Az alsó görbén egyszerre látható a MP és az AP-ok a felette levő görbe kinagyításaképp. (B) Egy antidromikus potenciál látható a nagy sejten (ld.: C) a PnC stimulációjának hatására (a potenciál a hatékony monoszinaptikus kapcsolatot mutatja). (C) Egy elvezetett átlagos (felület= 3905 μm^2) óriássejt. Calib.: 100 μm . A nyilak az axont jelzik. Rövidítések: LGN: a térdtestből mérhető PGO (Ponto-Geniculo-Occipitalis) hullámok, EOG: Elektro-okulogramm, S: NREM-alvás (lassú-hullámú alvás), T: átmeneti szakasz a S és a REM között, W: passzív ébrenlét, Wm: aktív ébrenlét

Ezeket az alacsony küszöbvel rendelkező LTBN neuronokat az ARAS több pontján, nevezetesen a ventrális PnO-ban (vPnO) (Nunez és mtsai., 1997) és a nyúltvelői tegmentumban (Gi) is leírták (Serafin és mtsai., 1996), mely azt jelzi, hogy a *formatio reticularis* óriás sejtjei egységes fiziológiai karakterisztikával rendelkeznek, annak ellenére, hogy a vPnO-ban találtak olyan neuronokat is amelyek spike genezise kalcium inszenzitív volt, de ezek feltehetőleg NBN-ok csoportjába tartoztak (Nunez és mtsai., 1997). A vPnO-ban levő idegsejtekről *in vitro* környezetben bebizonyosodott, hogy az acetil-kolin, a hisztamin és a glutamát depolarizálja a MP-jukat és AP sorozatot vált ki rajtuk, ellenben a gátló neurotranszmitterek képesek rajtuk hiperpolarizációt és AP gátlást létrehozni (ld.: **1.14 ábra**) (Nunez és mtsai., 1997; Nunez és mtsai., 1998).

A juxtacelluláris sejtjelölési technika bevezetésével (Pinault, 1996) alkalom nyílt uretánban altatott macskákban az extracellulárisan regisztrált sejteket morfológiailag is identifikálni. A vPnO-ban két sejtípust sikerült ilyen módszerrel leírni: az egyik típusra (I-es típus) a nem ritmikus tüzelési sajátosság volt jellemző, a másik (II-es típus) pedig ritmikus, tónikus (7- 22 Hz) tüzelési sajátossággal volt jellemezhető altatásban (ld.: **1.15 ábra A és B**) (Nunez és mtsai., 2002). Az I-es típus tartalmazta a burst-ös működésre képes óriás sejttestű neuronokat, míg a II-es típus a kis sejttestű nem tüzelő, vagy tónikus működési módú kisebb idegsejteket. Az *in vitro* kísérletekben az egyes típus feltehetőleg az LTBN neuronok csoportjába, míg a másik típus feltehetőleg az NBN neuronok csoportjába tartozott (ld.: **1.12 ábra E**) (Nunez és mtsai., 2002).

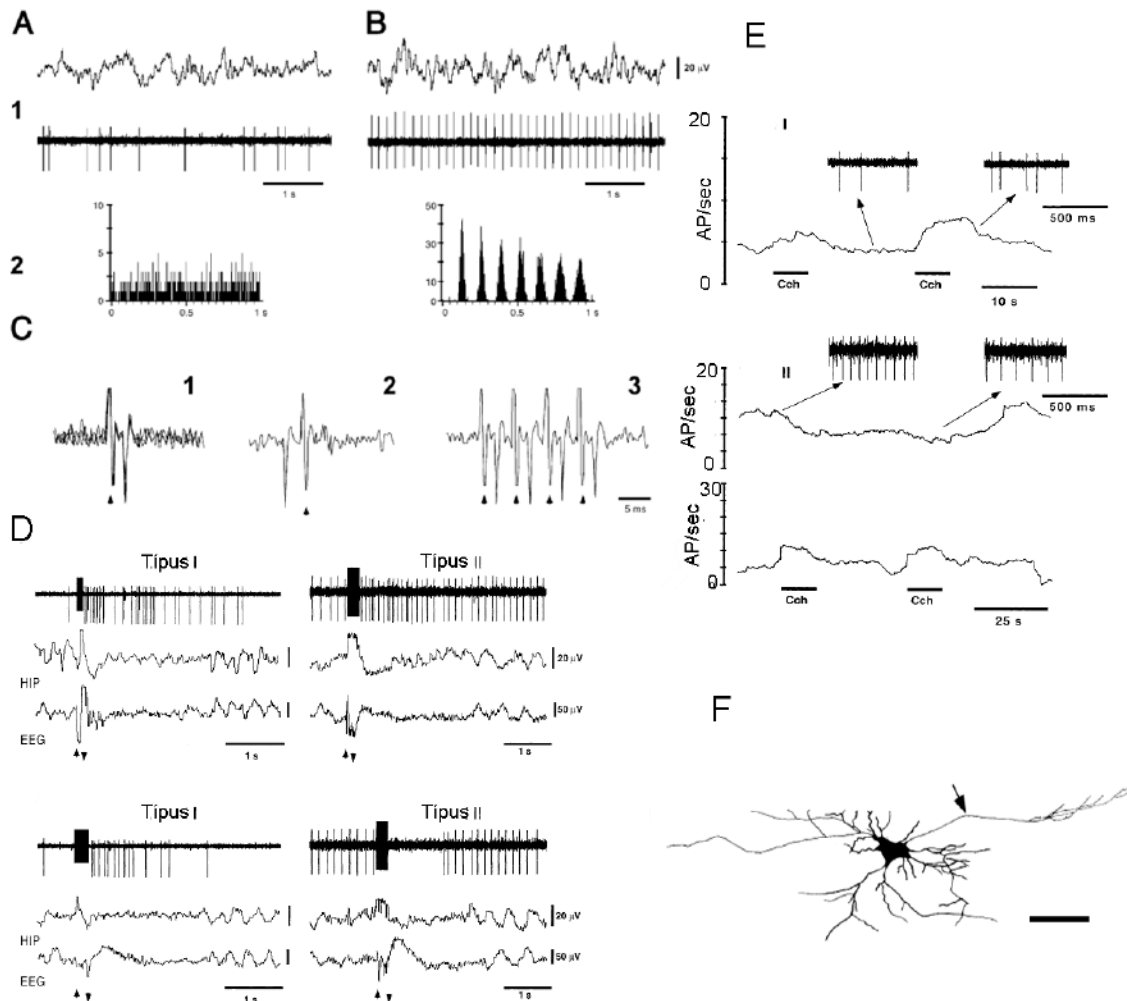
A McCarley munkacsoportja által a PnO/PnC határán leírt I-es típusú neuronok axonja főképp a gerincvelő felé indult (Mitani és mtsai., 1988a, c). Ellenben a vPNO-ban az említett kísérletben bebizonyosodott, hogy axonjaikat - ezek a nagy sejttestű sejtek - a kontralaterális oldalra, vagy aszcendálva projektálják (Nunez és mtsai., 2002). Itt fontos megjegyezni, hogy a *formatio reticularis* anatómiai szerkezete a patkányban és a macskában kissé eltér, ez megnehezíti a terület funkcionális anatómiájának megértését.



1.14 ábra Különböző neurotranszmitterek hatásai a vPnO neuronokra *in vitro*. (A) A glutamát (50 μ m) elhúzó depolarizációt és AP sorozatot okozott a vPnO-neuronokon (ld.: A felül). Rövid hiperpolarizáló áram impulzust alkalmaztak (0.2 pA, 200 ms), hogy megállapítsák a membrán ellenállást (ld.: A alul és D felül). Ezután egyensúlyi áramot injektáltak a sejtbe miután visszatért az alap membrán potenciál (ld.: A alul) (A: -72 mV) az adott farmakon hatása alatt (A és D). Ugyanannál a membránpotenciál értéknél a glutamát hatására az injekció hatására az ún. deflektió csökkent (ld.: alul a sarokban) (Nunez és mts., 1998). (B) A carbachol (3-5 μ M) depolarizáló és AP sorozatot kiváltó hatása a vPnO sejtek egyes- (I-es) (ld.: B felül) és kettes (II-es) típusára (ld.: B alul). Jól látható, hogy a II-es típus magasabb frekvenciájú AP sorozattal képes válaszolni (Nunez és mts., 1997). (C és D) A GABA és a szerotonin hiperpolarizálta a sejteket. A GABA (4 μ m) hatékonyan gátolta az AP-ok megjelenését (ld.: C). (D) Rövid hiperpolarizáló pulzusokat (0.2 nA, 500 ms) injektáltak a sejtekbe a GABA vagy a szerotonin (10 μ m) hozzáadása előtt és alatt (C és D ugyanabból a sejtől regisztrált görbék), miközben pozitív árammal tartották fenn az alap membránpotenciál értékét (C: -68 mV, D: -72 mV és -74 mV). A sarkokban a deflektiók láthatók (Steriade és Hobson, 1976; Nunez és mts., 1997). Fontos megjegyezni, hogy az A, C és a D ábrák görbéi anatómiailag identifikálatlan sejtekből származnak.

(Nunez és mts., 1998), (Nunez és mts., 1997)

Populációs szinten igaz volt ezekre az idegsejtekre, hogy közülük az I-es típus mind karbachol lokális beadására (ld.: **1.15 ábra E felül**), mind az ellenoldali PnO stimulálására, mind pedig a PPT stimulálására emelkedett AP tüzelési rátával válaszoltak (ld.: **1.15 ábra D**). A másik típus (II-es) viszont ezekre a hatásokra eltérő módon reagált. A II-es típusú, kis sejtesttel rendelkező és lokálisan projektáló idegsejtek (ld.: ld.: **1.15 ábra F**), a karbachol lokális beadására populációs szinten (Multi Unit Activity, MUA) egy elnyújtott csökkenését mutatták a tüzelési rátájuknak (ld.: **1.15 ábra E alul**), míg a kontralaterális PnO stimulációjának hatására voltak közülük olyanok, amelyek növekedett AP sorozat választ produkáltak, illetve olyanok is, amelyek csökkent frekvenciát mutattak (ld.: **1.15 ábra D**). A PPT stimulációjának hatására ebben a munkában leírtak olyan II-es típusú sejteket is, melyek rövid ideig beszüntették tüzelésüket (ld.: **1.15 ábra D**). A különböző stimuláció hatásokra adott eltérő válasza lokális szabályozó szerepükre enged következtetni. *In vitro* mérhető belső tüzelési sajátosságaik az NBN neuronokkal megegyezők voltak, melyet megerősít, hogy az AP genezisük Ca^{2+} független (Gerber és mtsai., 1989; Nunez és mtsai., 1997). Megjegyzendő, hogy ezeknek a sejteknek (II-es típus) a fiziológiai karakterisztikája patkányban és macskában is meglehetősen hasonló (Nunez és mtsai., 1997). A fent részletezett kísérletek tükrében feltételezhető, hogy ezek a II-es típusú idegsejtek gátló interneuronok lehetnek. Ugyanakkor a GABA-erg gátló idegsejtek jelenlétét az ARAS összes klasszikus magjában csak a közelmúltban sikerült igazolni anatómiai módszerekkel (Boissard és mtsai., 2003; de la Roza és Reinoso-Suarez, 2006). Azt, hogy az ARAS magjaiban levő II-es típusú idegsejtek GABA-erg interneuronok, úgy bizonyították, hogy a GABA-t szintetizáló a glutamát-dekarboxiláz egyik izoformáját kódoló (GAD67) génjének (*GAD1*) promóter régiójához zöld fluoreszcens fehérjét kötöttek (Green Fluorescent Protein, GFP), majd a génbevitt állatok agyából agyszeletet vágva *in vitro* körülmények között a GABA-erg idegsejtek szelektíven fluoreszkáltak (ld.: **1.17 ábra A és B, 1.16 ábra B**) (Brown és mtsai., 2008). A munka kétségtelenül bizonyította, hogy a PnO-ban és a subcoeruleusban (SuBC)



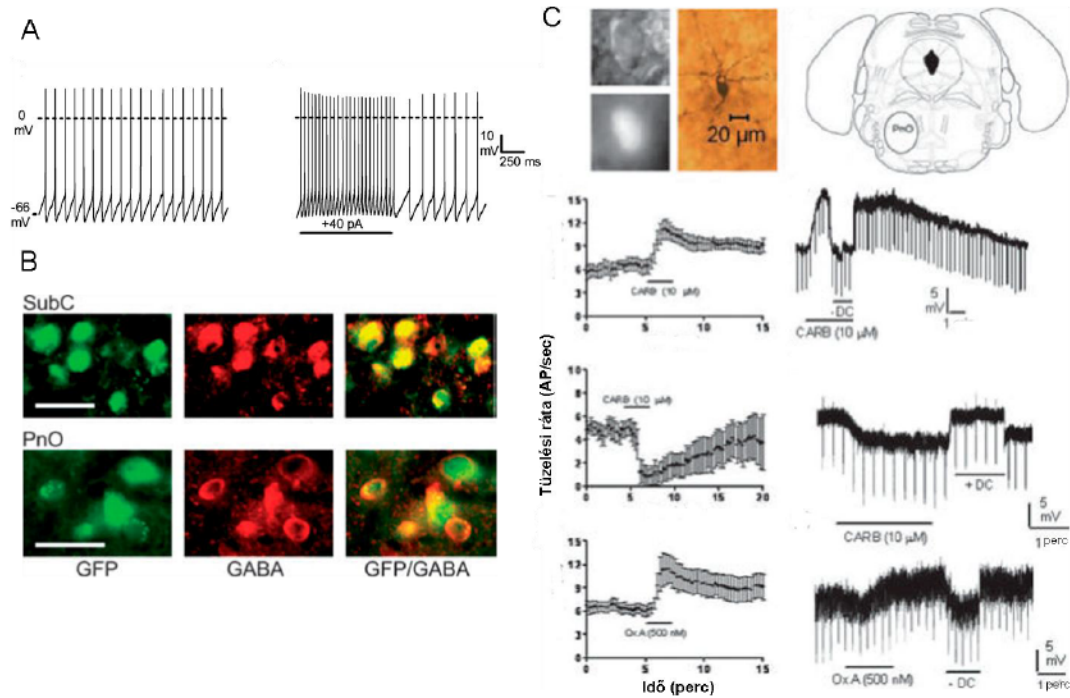
1.15 ábra A vPnO sejtek tüzelési sajátosságai *in vivo*. (A) I-es típusú sejtek AP tüzelési jellemzői altatásban. (B) II-es típusú sejtek AP tüzelési jellemzői altatásban (1.: Extracelluláris AP-ok, 2.: Autokorrelációk). (C) Antidrómikus aktiváció a kontralaterális vPnO ingerlésének hatására az I-es típusú sejteken (1.: az antidrómos AP-ok konstans latenciával jelennek meg, 2.: egy megelőző spike képes blokkolni őket, 3.: követik a magas frekvenciájú stimulációkat (200 Hz), ez monoszínaptikus kapcsolatot feltételez. A nyílhegyek a stimulációs artefaktokat jelölik. (D) A sejtípusok tüzelési sajátosságainak összehasonlítása a hippocampális LFP-vel és az EEG-vel. A kontralaterális vPnO stimulációjára mindkét típusú sejt megemelkedett AP tüzelési rátával válaszol, melyhez az EEG és a hippocampális LFP deszinkronizációja társul (D felül). A PPT stimulációjának hatására a II-es típusú sejtek közül többen vannak azok, amelyek csökkentik, vagy blokkolják AP-jaikat (D alul jobbra), míg az I-es típusú sejtek növelik tüzelési rátájukat (D alul balra). A nyílhegyek a stimulációkat jelzik. (E) Lokálisan beadott carbachol (Cch) hatására az I-es típusú sejtek növelik aktivitásukat (E felül), a II-es típusú sejtek pedig lassan csökkentik azt (E középen). Populációs szinten a vPnO sejtjei AP rátája összesítve emelkedik Cch hatására, mely a MUA rátájának növekedésében érhető tetten. (F) Egy II-es típusú, kontralaterális irányba projektáló sejt arborizációja. Kalib.: 50 μ m

kiterjedt gátló idegsejt hálózat van, melyeknek sejttest mérete a GABA-erg idegsejtekre jellemző 10-35 μm \AA között volt. Elektrofiziológiailag ezek az idegsejtek megfeleltethetők a II-es típusú idegsejteknek, azaz depolarizáló áraminjekció hatására tónikus tüzelési választ adtak (**1.16 ábra A**). Kolinerg agonisták keverékének hozzáadásával ezen interneuronok egyik csoportja megemelte tüzelési rátáját, míg egy másik csoport csökkentette azt (**1.16 ábra C**). Orexin hozzáadására tüzelési rátája jellegzetesen megnövekedett (közismert, hogy a központi idegrendszerbe az orexinerg sejtek poszt-szinaptikus célpontjai a GABA-erg idegsejtek) (**1.16 ábra C**) (Brown és mtsai., 2008). Természetesen az ilyen GAD67/GFP génbevitt állatokban a központi idegrendszer összes olyan GABA-erg sejtje, melyben ez a módosított gén kellő mennyiségben kifejeződik, zölden fog fluoreszkálni és ez nem teszi lehetővé ezen sejtek projekcióinak anatómiai feltérképezését (ld.: **1.17 ábra A és B**).

Azt, hogy a PnO-ban elhelyezkedő idegsejtek egy hálózatot alkotnak, mely sejtek masszívan innerválják a kontralaterális PnO-t is, úgy bizonyosodott be, hogy egy monoszínaptikusan terjedő, retrográd pályakövető anyag intenzifikálásával (immunperoxidáz reakció) és a GAD67 ellen termeltetett ellenanyag kettős immunreakcióval való megjelölésével *post mortem* összehasonlították a két fluoreszcens jel előfordulását. A kettős jelölődésű sejtek érdekes módon az egerek ARAS-nek klasszikus magjaiban voltak megfigyelhetők, és ez a kísérlet bizonyította azt is, hogy ezek a GABA-erg sejtek vetítenek a kontralaterális oldalra (Liang és Marks, 2009). Kiderült, hogy valószínűleg ezek azok az elektrofiziológiailag karakterizált II-es típusú idegsejtek, melyek az ARAS klasszikus magjainak lokális gátló idegsejtjei. Ezt a masszív lokális gátló hálózatot középagyi GABA-erg kolumnának (MPGC) nevezték el (**1.17 ábra B**) (Liang és Marks, 2009).

Összefoglalva, az *in vivo* környezetben leírt I-es típusú idegsejtek (*in vitro* LBTN neuronok), melyeknek óriás projekciós sejttestjeik glutamátergek, nem ritmikus tüzelési sajátossággal rendelkeznek. Ezek azok a neuronok, melyeknek tüzelési rátája az alvás-ébrenléti ciklusnak megfelelően képes változni. A II-es típusú ritmikus, avagy tónikus sajátosságú, kis sejttesttel rendelkező idegsejtek

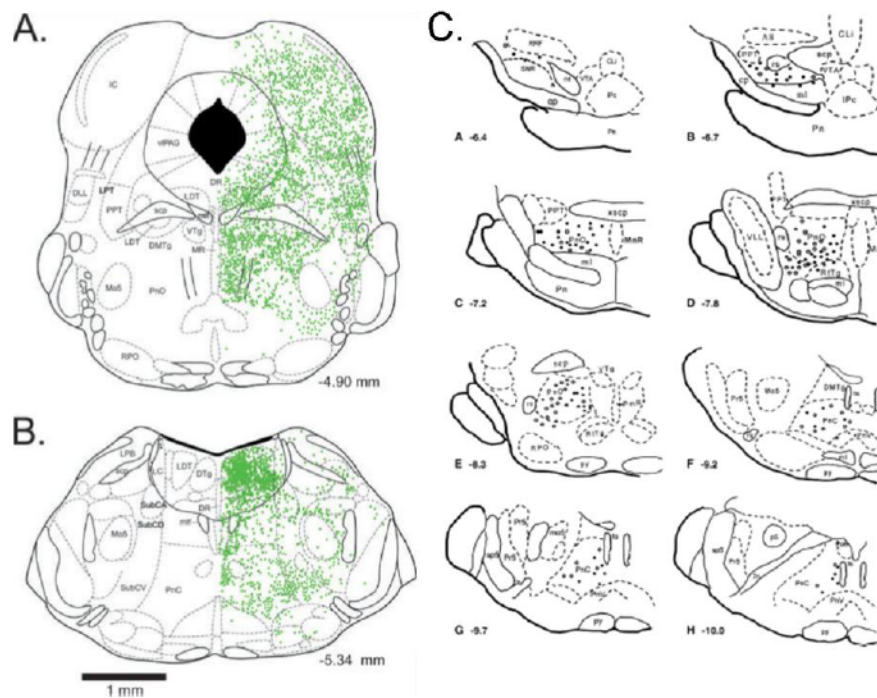
lokális, szabályozó GABA-erg neuronok, melyek *in vitro* az NBN neuronoknak feleltethetők meg, és tónikus üzemmódban képesek tartós gátlás alatt tartani az I-es típusú sejteket. Itt fontos megjegyezni, hogy a PnO/PnC határán *in vitro*



1.16 ábra A GABA-erg sejtek tüzelési jellemzői *in vitro*. (A) A belső membrán tulajdonságai a PnO és a SuBC GAD67/GFP pozitív idegsejtjeinek. Az alapaktivitásukra tónikus tüzelési mód jellemző (A bal felső sarok), melynek rátája depolarizáló áramra növekedett választ ad (A job felső sarok). (B) A GAD67/GFP sejtek zölden fluoreszkálnak (ld.: balra) a PnO-ban és a SuBC-ban. Középen pirossal a GABA-t septavidin-Cy3 vörös fluoreszkáló festékkel jelölték (ld.: középen). Jól látható, hogy a két festődés kolokalizál (ld.: jobbra). (C) Infravörös differenciál interferencia kontraszt (IR-DIC) kép (C jobbra fent) egy *post hoc* biocitinnel feltöltött (C sárga mezőben) GFP pozitív PnO sejtről. (C) Acetil-kolin agonisták keverékére (CARB) adott eltérő tüzelési válaszok. Még extracellulárisan mérve (C bal oszlop) és ún. 'whole-cell current-clamp' módban (C job oszlop). A PnO GABA-erg sejtjeinek egyik csoportja excitációval, míg másik csoportja gátlással reagált. Orexin hatására (Ox A) minden sejt excitációval válaszolt. Hiperpolarizáló áram injekciókat (-DC) használtak, hogy összehasonlítsák az adott sejt bemeneti ellenállását a membrán potenciállal.

(Brown és mts., 2008)

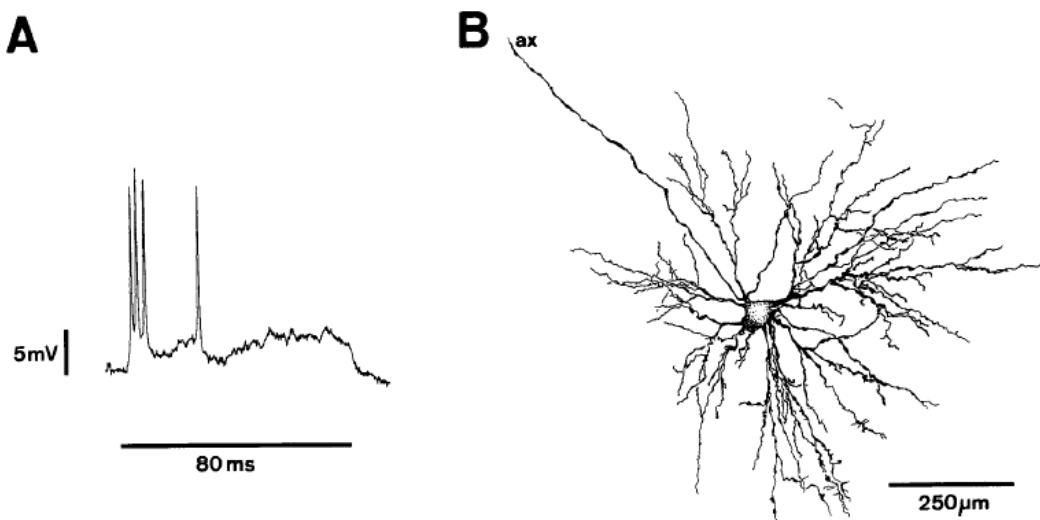
leírt HTBN neuronok jelenlétét más területeken ez idáig nem sikerült igazolni, sem pedig morfológiailag, vagy neurokémiailag jellemezni őket. Ezen kívül mindenképpen meg kell emlékeznünk arról, hogy az ARAS klasszikus magjaiban az óriás sejttestű és kis sejttestű idegsejteken kívül számos átmeneti állapot van, melyek nyilvánvalóan nem sorolhatók be a fentebb részletezett neurokémiai, fiziológiai és morfológiai kategóriákba. Ezek az idegsejtek lehetnek szerotoninergek, dopaminergek vagy egyéb neurotranszmitter rendszerhez tartozókak (Holmes és Jones, 1994; Maloney és mtsai., 1999, 2000; Giber és mtsai., 2008; Varga és mtsai., 2009).



1.17 ábra A GABA-erg idegsejtek elterjedése az ARAS magjaiban. (A és B) A GAD67/GFP génbevitt egerekben az interneuronok zölden fluoreszkáltak (Brown és mtsai., 2008). (C) Sematikus áttekintő ábra a kettősen (CTb/GAD67) jelölődő lokális interneuronokról (telt körök) összehasonlítva a csak retrográd pályakövető anyaggal jelölődő sejtekkel (üres körök). A kettősen jelölt sejtek alkotják az MPGC-t (Liang és Marks, 2009). Rövidítések: DLL, dorsolateral lemniscus; DMTg, area dorsomedialis tegmentalis; DTg, nucleus dorsalis tegmentalis; DR, nucleus raphe dorsalis; IC, inferior colliculus; LC, locus coeruleus; LDT, laterodorsal tegmentum; LPB, nucleus lateralis parabrachialis; LPT, tegmentum pontis lateralis; mlf, fasciculus medialis longitudinalis; Mo5, nucleus trigeminalis; MR, nucleus raphe medialis; PnC, nucleus reticularis pontis caudalis; PnO, nucleus reticularis pontis oralis; PPT, area pedunculopontinus tegmentalis; RPO, regio rostralis periolivarius; scp, superior cerebellar pedunculus; SubCA, subcoeruleus nucleus, alpha partio; SubCD, subcoeruleus nucleus, dorsalis partio; SubCV, subcoeruleus nucleus, ventralis partio; vIPAG, grisea ventrolateralis periaqueductalis; VTg, nucleus ventralis tegmentalis (Gudden).

Az MRF (DpMe) projekciós sejtjeiről, melyek számája markánsan kisebb, mint a PnO-é vagy a PnC-é bebizonyosodott, hogy a thalamus intralaminális magjaiba vetítenek és ezeken a magokon fejtik ki agykérget aktiváló hatásukat. Jól tükrözi azt a trendet, melyet már említettünk, hogy az ARAS magjaiban mennél rostrálisabban helyezkedik el egy magcsoport, annál több felszálló rostot indít (Oakson és Steriade, 1982; Steriade és mtsai., 1982; Steriade és McCarley, 1990).

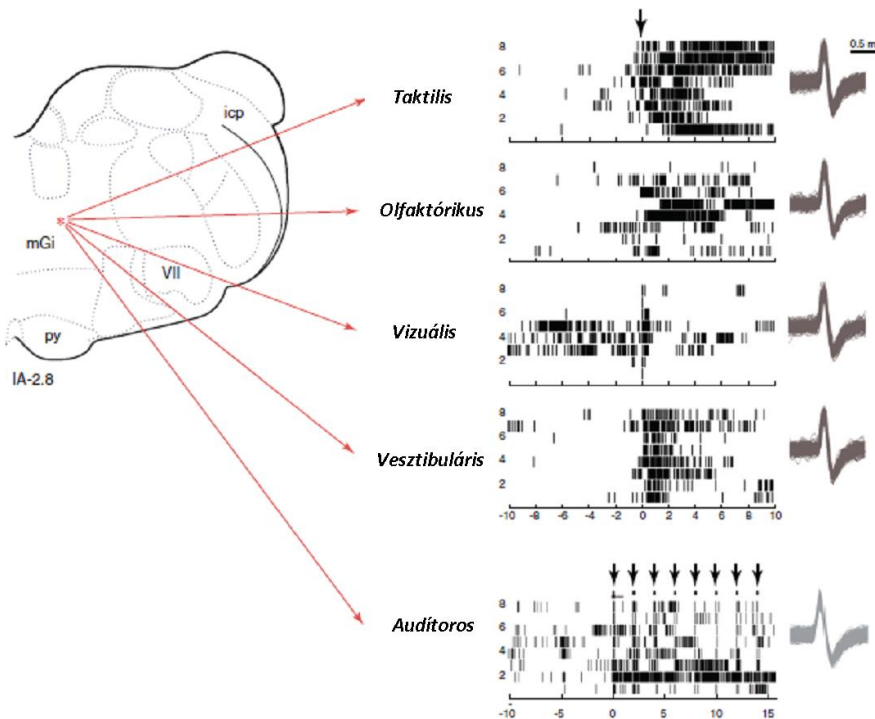
A PnC-ben és a Gi-ben lévő óriás idegsejtek számos reflexkör közvetítésében is szerepet játszanak. Ezek közül terjedelmi korlátok miatt, most csak a számunkra fontos, auditoros ingerre kiváltott, megrezzenési reakcióról számolunk be (ld.: **1.18 ábra**) (Lingenhohl és Friauf, 1994). A nyúltvelői Gi-ben található óriás sejtek, érdekes módon az összes szenzoros modalításra burst-ös válasszal képesek reagálni (Martin és mtsai., 2010). Emiatt újabban őket tartják a szenzoros aktivációs hatások közvetítőjének az ARAS felsőbb magjai felé (ld.:**1.19 ábra**) (Pfaff és mtsai., 2012).



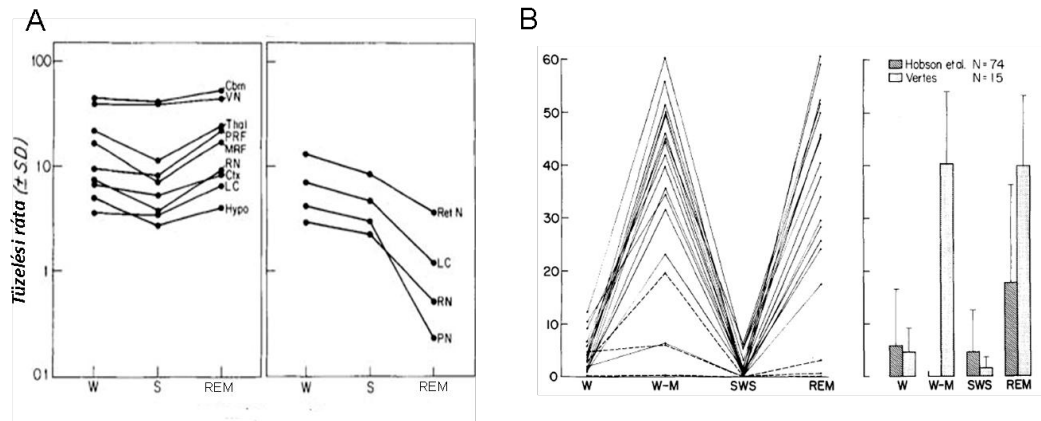
1.18 ábra A PnC sejtek auditoros ingerre adott válasza *in vivo* intracelluláris elvezetésben. (A) Koppanó hangingerre adott excitátoros AP-ok (MP= -51 mV). (B) A tormaperoxidázzal megjelölt idegsejt szomato-dendritikus morfológiája axonnal.

(Lingenhohl és Friauf, 1994)

Azok az elenyésző számban megfigyelt esetek, melyekben fejbefogott állaton sikeresen vezettek el a *formatio reticularis*-ból intracelluláisan, arra engedtek következtetni, hogy a *formatio reticularis* nagy sejtjeinek óriási szerep jut az irányított mozgások inicializálásában (ld.: **1.20 ábra A**) (Hobson és Steriade, 1986; Steriade és McCarley, 1990). Ezenkívül bizonyossá vált, hogy a fejbefogott állapot alkalmatlan ezeknek a sejteknek ébrenlétet előidéző, vagy fenntartó szerepének a tisztázására (Ito és mtsai., 2002). A szabadon mozgó macskák PnO/PnC határából extracellulárisan elvezetett egysejt aktivitások bizonyították, hogy ezen idegsejtek a fejbefogott állapothoz képest szabadon mozgó környezetben nem csak a REM, hanem az aktív ébrenlét alatt is markánsan megemelik tüzelési rátájukat (ld.: **1.20 ábra B**). Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy az ARAS magjaiból szabadon mozgó állapotban csak néhány sporadikus kísérletben sikerült egysejt aktivitásokat elvezetni (Hobson és mtsai., 1975; Siegel és mtsai., 1977; Vertes, 1977, 1979). Emiatt az ARAS idegsejtjeinek tüzelési sajátosságainak összehasonlító leírása szabadon mozgó állapotban, rendkívül indokolt lenne.



1.19 ábra Immobilizált állat Gi sejtjeinek multimodális szenzoros válaszai. Fontos észrevenni, hogy a vizuális ingerekre adott válaszok is megjelentek, bár csökkent mértékben. Az auditoros stimulációkat repetitíven ismételték a megjelenésük rövid latenciája miatt. Nyilak: ingeradások időpontja.
(Martin és mts., 2010)



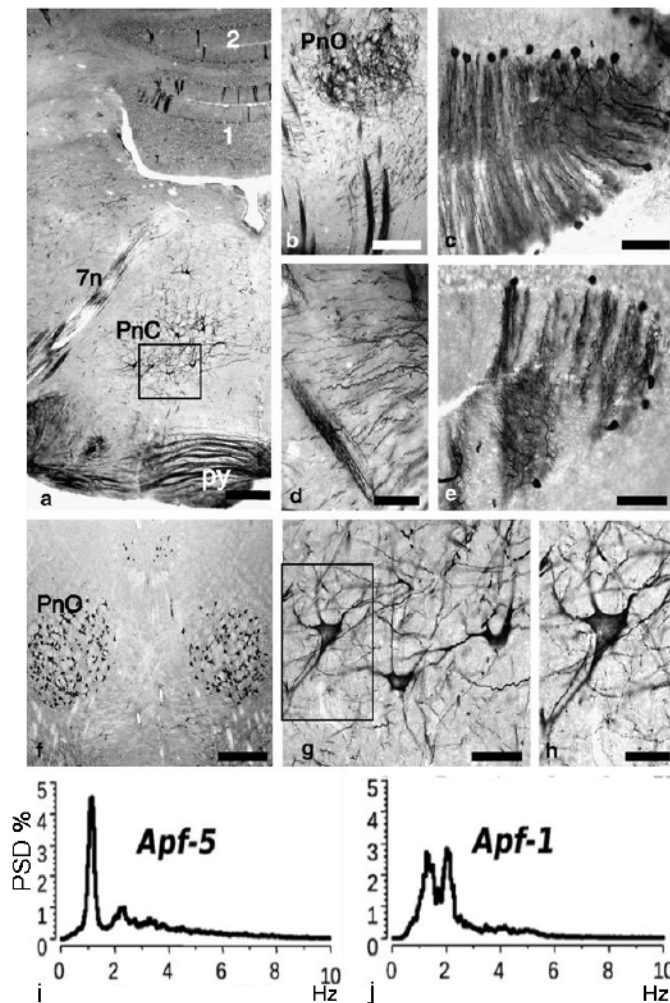
1.20 ábra A fejbefogott macskák különböző struktúráiból elvezetett egysejtaktivitások (A) és a PnO/PnC határról szabadonmozgó macskákból történt elvezetések rátaváltozásai az alvás-ébrenléti ciklus alatt. (A) A különböző területek AP rátaváltozásai ébrenlét (W) NREM-alvás (S) és REM-alvás alatt fejbefogott állatokban (Steriade és Hobson, 1976). (B) Szabadonmozgó macskákból mért extracelluláris AP-ok aktivitásai és összehasonlításuk a nem aktív ébrenlétben mért előzetes adatokkal (átlag tűzelési ráták) (Vertes, 1977). Rövidítések: Cbm, cerebellaris Purkinje sejtek; VN, n. vestibularis sejtek; Thal, thalamikus sejtek; PRF, hídi *formatio* reticularis sejtek (PnO/PnC határ); Ctx, sejtek a cortexből; Hypo, hypothalamus, Ret N, N. reticularis thalami; RN, raphe; PN, peribrachiális neuronok.

(Steriade és Hobson, 1976), (Vertes, 1977)

1.4.3. Az ARAS magjaiban levő óriás sejttestű neuronok feltehetőleg szelektíven sérülnek a fokális epilepszia generalizációjakor

Kutatócsoportunk feltárta, hogy ha szomato-motoros kéregre fokálisan egy epileptikus hatású K^+ - csatorna blokkoló 4-aminopiridin (4-AP) kristályt helyezünk, akkor az állatok kezdetben fokális-parciális rohamai folyamatosan generalizált rohamokká fejlődnek (Baracska és mtsai., 2008). Az epileptikus rohamok generalizációja során excitotoxikus sérülést szenvedő sejteket, amelyeket a Gallyas-féle argyofil reakcióval (III-as típus) mutattunk ki (Gallyas és mtsai., 1990; Gallyas és mtsai., 1993), akkor sikerült megfigyelni az ARAS klasszikus magjaiban, amikor az állatok a *status epilepticus* fázisába jutottak (1.21 ábra) (Baracska és mtsai., 2008). Amikor a *status epilepticus*-os állatok EEG-je markánsan lassú hullámú aktivitással rendelkezett (1.21 ábra i és j) az ARAS klasszikus magjaiban a projekciós óriás sejtek ezüstözödtek szelektíven.

Az ezüstöződés a sejtek korai excitotoxikus állapotát mutatja ki igen szenzitíven (van den Pol és Gallyas, 1990). Az eredmények alapján feltételeztük, hogy ezek az idegsejtek az epilepszia kezdeti generalizációjában fontos szerepet játszanak, ugyanakkor a *status epilepticus* végső stádiumának megjelenésekor szelektív sérülést szenvednek. Ezen kísérletek alapján azt nem lehet kizárni, hogy ezen sejtek 'sötétté' válása - a kortikális 4-AP kristály applikáció után - nem csupán a transz-szinaptikus excitotoxicitás eredménye, hanem a rohamok propagálódása következtében kerültek patológiás állapotba.



1.22 ábra A PnO-ban és a PnC-ben levő óriás sejtek (a, b, f, g és h) a *status epilepticus* lassú-hullámú aktivitással jellemezhető, generalizált szakaszában jelentek meg (i és j). 'Sötét' idegsejtek (a és f-h), axonok (a, b és d) és kisagy Purkinje-féle sejtek (c és e) a hidi *formation reticularis*-ban és a kisagyban. Az óriás idegsejtek az ARAS magjaiban akkor voltak váltak ezüstöződővé, amikor az állatok EEG-jén lassú hullámú aktivitás vált dominánssá, melyet a teljesítmény spektrumok (Power Spectral Densities, PSD) jól mutattak (i és j). Apf-5 és Apf-1 individuális állatjelölések, mely állatokból a mutatott metszetek készültek (Apf-5: a-e, Apf-1: f).

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az ARAS klasszikus magjai közül a mediális PnO az amelyik a legkevésbé kutatott. Mivel bizonyított, hogy számos olyan, tudatvesztéssel járó patológiás állapotban, melyben a fronto-parieto-occipitális kérgék funkcionális kapcsolata szakad meg, a PnO volt patológiásan érintett (Parvizi és Damasio, 2003b; Watanabe és mtsai., 2004; Alkire és mtsai., 2008; Supp és mtsai., 2011), szeretnénk volna megvizsgálni szabadonmozgó állatokban a PnO sejtjeinek működését. Az agykéreg és a PnO kapcsolatának pontos anatómiai és funkcionális ismerete elméleti szempontból a tudatos állapot megértése miatt érdekes, gyakorlati szempontból pedig az altatók hatásmechanizmusa, az alvászavarok és az ún. kortikális „diszkonnekciós szindrómák” (pl.: skizofrénia) megértése szempontjából fontos. Ezért emeltünk ki néhány fontos kérdést, ami nem kellően tisztázott:

1. Van-e szerepe a PnO óriás sejtjeinek az epilepsziás aktivitás generalizációjában és amennyiben igen, akkor ezen sejtek reverzibilis sérülése milyen szerepet játszik a rohamok következtében kialakuló tudatvesztésben.
2. Mivel az ARAS sejtek aktivitásának alvási stádium függése csak immobilizált vagy altatott állatokban történt mérésekből ismert, szabadon mozgó állatokban meg kell vizsgálni mi érvényes az ismeretekből, ha sem altató, sem immobilizációs stressz hatással nem keveredik a vizsgált sejtaktivitási mintázat.
3. Ismeretlen, hogy a PnO funkcionálisan milyen struktúrákon keresztül fejt ki ébresztő hatását. Ennek vizsgálatára leginkább az fMRI BOLD aktivációs térkép megfelelő.

3. KÉRDÉSFELVETÉS

3. 1 Előkísérleteinkből bebizonyosodott, hogy a fokális-kortikális rohamok generalizációjához (*status epilepticus*) a *formatio reticularis* óriás sejtjeinek szelektív sérülése társulhat (Baracska és mtsai., 2008). Szerettük volna megvizsgálni, hogy a jelenség általános-e más módon előidézett epilepsziák progressziója alatt a következő szempontok szerint:

- A hídi gigantocelluláris állomány szelektív sérülése előáll-e más szisztémásan kiváltott epilepszia modellekben is (kainát, pilokarpin és fokális 4-AP?)

- Az epilepszia progressziója során, melyet elektrofiziológiailag és magatartási szinten monitoroztunk, pontosan mikor következik be az óriás sejtek 'sötétté' válása?

3. 2 Feltételeztük, hogy a *status epilepticus* kései stádiumában megjelenő komatikus állapotot, melyhez lassú-hullámú EEG és *atonia* társult, az ARAS óriás sejtjeinek funkcionális hanyatlása okozza úgy, hogy képtelenek tovább közvetíteni a szenzoros információk aktiváló hatását az agykéregbe (Baracska és mtsai., 2009). Érdekelt minket, hogy szabadonmozgó állatokban milyen aktivitással rendelkeznek az ARAS magjainak sejtjei. Kérdéseink a következők voltak:

- A szabadonmozgó patkányok PnO-jából extracellulárisan elvezethető óriás sejtek AP-jainak tüzelési aktivitása 'arousal' függő-e?

- Hogyan viszonyulnak egymáshoz a DpMe-ből és a PnO-ból paralel elvezethető különféle típusú idegsejtek AP-jainak kisülési jellemzői az alvás-ébrenléti ciklus alatt?

- A több csatornán, szimultán regisztrált sejtek között elvezethetők-e monoszinaptikusan kapcsolt sejtpárok, és ha igen akkor kapcsolatuk erőssége változik-e az alvás vagy ébrenlét alatt?

- A PPTg kolinerg hatásait tetten érhetjük-e a PnO interneuronjain működés közben?

- Milyen hatással van az állatok magatartására, EEG-jére és kiváltott válaszaira, ha a PnO-t bilaterálisan paralizáljuk.

3. 3 A PnO lokális stimulációja hatékonyan okozott *arousal* hatást az anesztézia alatt, mely az EEG deszinkronizációjában és a kérgi idegsejtek MUA-nak perzisztens növekedésében volt tetten érhető a stimuláció után (Liu, 2012; Pillay, 2013). Ahhoz, hogy tisztázzuk mely struktúrák közreműködésével fejt ki a PnO az EEG-n a generalizált *arousal*-t, az altatott állatokat - fMRI-BOLD képalkotás mellett - EEG-vel monitoroztuk a stimuláció alatt és után. Felmerülő kérdéseink voltak:

- A PnO '*arousal*' hatására előálló EEG deszinkronizációkor mely kérgi régiók között növekszik meg a funkcionális konnektivitás (FC) a fMRI-BOLD képalkotások során?

- Eldönthető-e az FC növekedésével, hogy mely kéreg alatti struktúrák közvetítik az '*arousal*'-t?

4. METODIKA

4.1 Állataink

A dolgozatban ismertetett kísérletek folyamán összesen 54 db felnőtt, hím Sprague-Dawley (250-350 g; Charles River Laboratories, Hungary és Wilmington, MA, USA) patkányt használtunk fel. Azt a 42 db-ot, amelyet az ELTE Proteomikai Laboratóriumában vetettük alá a kísérleteknek a hatályos magyar állatvédelmi törvénynek (1998, XXVIII, 243/1998) megfelelően tartottuk és kezeltük. Az állatok elhelyezése 12 órás fény/sötét ciklusban és standard körülmények között volt megoldott a kísérletek előtt és után, miközben táplálékhoz és vízhez korlátlanul fértek hozzá. Az fMRI-BOLD technológiával vizsgált patkányok (12db) a Medical College of Wisconsin (Milwaukee, WI) saját agyi képalkotó centrumának (Center for Imaging Research, MACC Fund Research Center) területén érvényben levő állatvédelmi szabályok szerint tartottuk és kezeltük a kísérletek folyamán (Medical College of Wisconsin's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)).

4.2 A 4-aminopiridin (4-AP) kristály fokális-kortikális felhelyezése

Az így kezelt (N=5) patkányokat 1-1.5 MAO%-os halotán anesztéziában sztereotaxisba fogtuk (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA), majd a parieto-okcipitális kéreg felé (A: 6,2 mm, L: 2,5 mm) 1-1,5 mm átmérőjű lyukat fúrtunk a koponyán. Ezután sztereo-mikroszkóp segítségével eltávolítottuk a kemény agyhártyát és az agykéreg felszínére helyeztünk 0.5 mg/tskg 4-AP kristályt (4-aminopridine, Sigma-Aldrich, Hungary). A kristály felhelyezése után a furatot fibrines sebészeti szivaccsal zártuk le (Spongostan, Hungaropharma, Budapest). 40 perc után a furatot fiziológiás sóoldattal kimostuk és csontviasszal (Medicommers Kft., Budapest) lezártuk, majd a halotán anesztéziát megszakítottuk. Egy állat a kezelés hatására elpusztult ezt nem vetettük alá további vizsgálatoknak.

4.3 4-AP, pilokarpin és kainát szisztémás beadásai

Epilepsziás rohamokat indukáltunk 4-AP (Sigma-Aldrich, Hungary, 4,5-5 mg/tskg i.p., N=7), pilokarpin (pilocarpine hydrochlorid, Sigma-Aldrich, Hungary, 340-370 mg/tskg i.p., N=6) és kainát (kainic acid, Sigma-Aldrich, Hungary, 10 mg/tskg s.c., N=4) alkalmazásával. A beadások után 10 perccel állataink rohamozni kezdtek és körülbelül másfél órás túlélésnél SE állapotba kerültek. A 4-AP i.p. alkalmazásakor három állat elpusztult, őket hisztopatológiai elemzésnek nem vetettük alá.

4.4 Szisztémás kainát kezelés, mint második beadás 4-AP és/vagy pilokarpin után

Azokban az esetekben, melyekben a pilo (N=2) vagy a 4-AP (N=2) nem okozott SE-t, a második nap szubkután injektáltunk Ka-ot állatainkba. Ezek a KA-al kezelt állatok (N=4) másfél óra után SE állapotba kerültek.

4.5 A Racine-féle magatartási skálázás

Állatainkon az epilepszia kifejlődését magatartási szinten a Racine-féle skála (Racine, 1972) módosított változatával (Medina-Ceja és mtsai., 2008) követtük nyomon. A skála szintjei: (0).nincs változás, (1) mozdulatlanság, szőr borzolás, gyorsult lélegzés, nyálzás és/vagy bajusz mozgatás esetleg sztereotip rágás, (2) sztereotip fejbólogatás, fej és szem klónus, (3) elsővégtag klónus és/vagy reszketés, (4) klónusos roham (első és/vagy hátsóvégtag klónus), (5) genarilzált klónusos roham (ugrások és kitöréses rohamok), (6) komatikus állapot atóniával.

4.6 Az SE EEG követése

Az állatok koponyájára a kezelések előtt egy héttel halotán anesztéziában 6 bemélyedést fúrtunk a koponyába a csont elvékonyításával. Az így kialakított csont medrekbe konduktív pasztát helyeztünk (TEN20 EEG 8OZ JAR) amikbe belehelyeztük a teflon-szigetelt rozsdamentes acél regisztráló elektródjainkat bilaterálisan a frontális, szomatoszenzoros és okcipitális kéreg felé. Az

elektrodákat és a konnektort fogászati cementbe (UniFast, GC America Inc., Chicago, USA) ágyasztuk. Az így kialakított elvezetési helyek nem érintették a kemény agyhártyát. Az EEG aktivitást egy Grass EEG 8B modellel regisztráltuk (Grass Instruments, Quincy, MA, USA) és 0,3 - 70 Hz között vezettük el. Az adatokat egy CED 1402A típusú rendszerrel digitalizáltuk Spike2 v2.1-es szoftverrel (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK), a digitalizációs frekvencia 3000 Hz volt. A teljesítmény spektrumokat 1 órás szakaszokból számoltuk NeuroExplorer v.3.2 program segítségével (Nex Technologies, MA, USA). A generalizált konvulzív rohamokat a jellegzetes EEG képük alapján a Treiman-féle fázisok szerint osztályoztuk: (1) diszkrét rohamok, (2) gyakori rohamok változó amplitúdóval és frekvenciával, (3) folyamatos iktális aktivitás, (4) folyamatos iktális aktivitás, mely meg-meg szakad izoelektromos szakaszokkal és (5) periodikus epileptiform kisülések, izoelektromos ('lapos') EEG szakaszokkal (Treiman és mtsai., 1990).

4.7 Perfúzió és metszés

Az állatokat uretánnal altattuk túl (2 g/tskg i.p., Sigma-Aldrich, Hungary) és ezután először fiziológiás só-oldatot, majd ezt követően 4%-os paraformaldehid-oldatot juttattunk transzkardiális perfúzió segítségével az állatok érrendszerébe (Gallyas és mtsai., 1993). Az agyakat egy nappal később vettük ki a koponyából, majd 2-3 napon keresztül posztfixáltuk őket ugyanebben (4% paraformaldehid) a fixáló oldatban. Ezután fagyasztva metszéssel 60 µm vastagságú metszeteket készítettünk belőlük.

4.8 Gallyas-féle sötét sejt ezüstözés

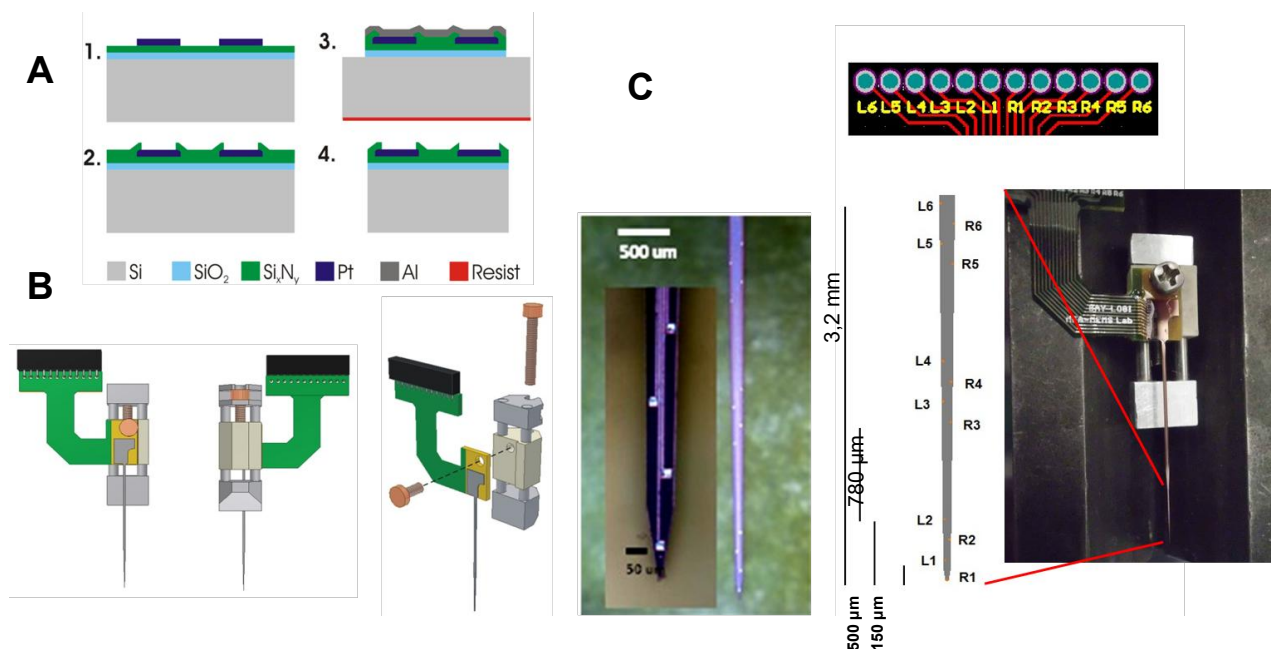
A metszeteket 16 órán keresztül inkubáltuk 56C°-on észterifikáló oldatban (1-propanol (Reanal, Budapest) és 1,2% kénsavban (Carlo Erba Reagents, Italy). A metszeteket ezután 1%-os ecetsavas oldatban 5 percig előkezeltük, majd sziliko-wolframsavas előhívó oldattal sárgásbarnává festettük őket (Gallyas és mtsai., 1990; Gallyas és mtsai., 1993). Az előhívást 1%-os ecetsav oldattal állítottuk le.

4.9 Egy szilícium (Si) alapú, speciális mikroelektród tervezése és kivitelezése

Célunk az volt, hogy egy egyetlen szűrt csatornában mozgó Si mikroelektród aktív kontaktusai egyszerre legyenek jelen az ARAS (DpMe, PPtg és PnO) elkülönült magjaiban, ezáltal legyen esélye annak, hogy ezen magvakból parallel tudjunk elvezetni eAP-okat. A munka az MTA Műszaki Fizikai és Anyagtudományi Kutatóintézetének MEMS laboratóriumában zajlott *Márton Gergely, Fekete Zoltán és Pongrácz Anita* mérnökök közreműködésével. Ahhoz, hogy ezzel az anatómiai viszonyokhoz tervezett és kifejlesztett Si „probe”-al elérjük a kívánt célterületeinket, egy speciális rosztro-kaudális irányú ferde célzást alkalmaztunk. A ferde célzás következményeként a Si alapú elektród alapjának, testének és hegyének összhossza 30 mm volt. Az Si elektród teste 200 μm -t tett ki. A 3x4 aktív kontaktust hordozó elektród hegy fokozatosan csökkent a hegy felé, 130 μm tól 60 μm -ig (ld.: **4.1 ábra C**). A távolság az elektród hegyének végétől az első kontaktus közepétől 92 μm -t tett ki (ld.: **4.1 ábra C**). Az elektród hegy szöge 19 fokban vékonyodott (ld.: **4.1 ábra C**). Az elektród hegyének és testének eredése 25 mm-re volt egymástól. Az elektród 12 db négyzet alakú (15 μm x 15 μm) platina (Pt) elvezetési kontaktust tartalmazott, amelyek az elektród hegyének első 3,2 mm-én voltak elosztva (ld.: **4.1 ábra C**). Minden egyes elektród csapat 4 kontaktust tartalmazott az elektród felszínének szélén, egymástól 150 μm távolságra. Minden egyes csoport 780 μm -re helyezkedett el egymástól. Az aktív kontaktusok Pt kivezetése 4 μm -ekre volt elhelyezve egymástól és a szélességük 300 nanométer volt (ld.: **4.1 ábra A**). Az elektród kialakításának részletes metodikai lépéseit terjedelmi korlátok miatt nem részletezzük (Marton és mtsai., 2012b; Marton és mtsai., 2012a; Pongrácz és mtsai., 2013).

4.10 A nyomtatott áramkör alapú (PCB) flexibilis kábel kialakítása, elkészítése

Annak érdekében, hogy az elektród és a konnektor közti szabad mozgathatóságot biztosítsuk, egy flexibilis PCB alapú kábelt dogoztunk ki.



4.1 ábra A Si-elektrod/flexibilis –PCB kábel/mikromozgató rendszer. (A) Az elektrod kialakításának főbb lépései (Marton és mts., 2012b; Marton és mts., 2012a; Pongrácz és mts., 2013): 1 : SiO_2 / Si_3N_4 rétegek felvitele és a Pt vezeték kialakítása 2 : a Si_3N_4 passzívációs réteg felrétegzése után a kontaktusok felől szelektíven eltávolítottuk azt 3 : egy alumínium (Al) maszk bevonatot készítettünk, mely után száraz maratással eltávolítottuk a hordozó és passzíváló rétegeket, az elektrod hátoldalát egy speciális fotorezisztens réteggel zártuk le ('resist'). 4 : az elektrod végső formájának keresztmetszete a maszk és záró rétegek eltávolítása után. (B) A Si-elektrod/flexibilis (PCB) kábel/mikromozgató rendszer áttekintő képe. Részletek a szövegben. (C) Az elektrod aktív kontaktusainak elhelyezése és kicsatolása a konnektorra. Részletek a szövegben.

A mikromozgató hordozó részén a kábel egy merev lemezzel rendelkezett, amely 1 mm vastag FR 4-es anyagból (üveggyapot és epoxi gyanta speciális keveréke) állt. A belőle eredő flexibilis kábel 50 μm vastag polyimid volt. A vezető réteget rézből alakítottuk ki, amelyet utána arannyal vontunk be. Az elrendezés geometriáját a **4.1 ábra B** és **C** részlete mutatja be. A 6 mm x 9 mm-es merev része hordozta a Si alapú elektrodot és egy 2 mm-es lyukkal csatlakozott a mikromozgatóhoz (ld.: **4.1 ábra B** és **C**). Az L alakú flexibilis kábel 200 μm széles vezetővel csatlakozott a preci-dip (Preci-Dip 850-PP-N-050-20-001101) konnektor részéhez, amely hordozta a 12 pin-t (ld.: **4.1 ábra B** és **C**).

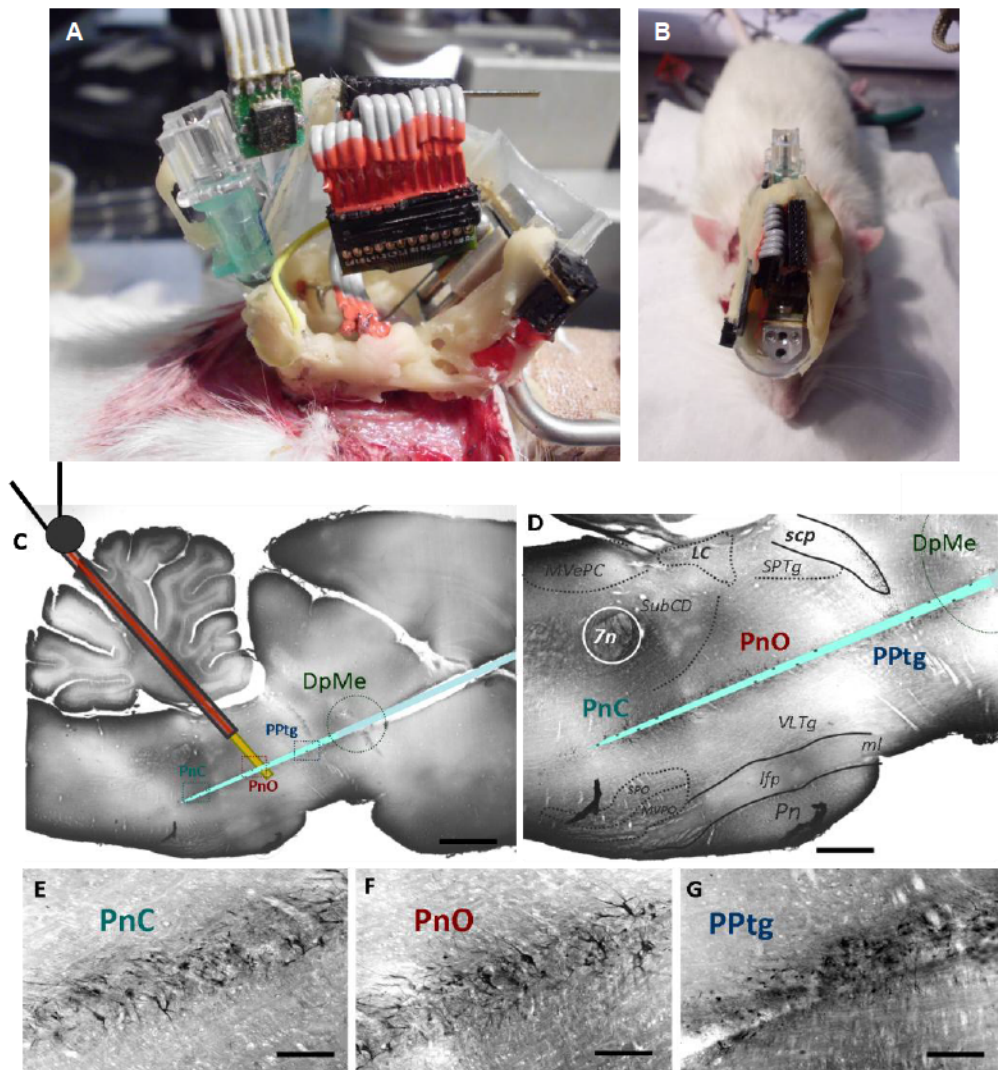
4.11 A mikromozgató

Ahhoz, hogy a rendkívül hosszú elektród testtel rendelkező Si 'probe'-unk ne okozzon kiterjedt szöveti sérülést, egy rendkívül stabil, vibráció mentes mikromozgatót fejlesztettünk ki, amely képes úgy mozgatni az elektródot a mély agyi struktúrában, hogy az minimálisan sem mozdul el. A mikromozgatót *Plósz Béla* finomműszerész kivitelezte. Ennek érdekében egy 3 blokkból álló oktagonális prizma alakú mikromozgatót dolgoztunk ki (ld.: **4.1 ábra B és C**). A felső blokk tartalmazta a mozgató csavart, és az alsó blokk, mely alumínium sajtolással alakult ki, stabilizálta a rendszert. Az elektródot az említett flexibilis PCB kábel merev részével rögzítettük a mikromozgató csavarjához (ld.: **4.1 ábra B**). A középső blokk tartotta az elektródot és ez a blokk két szorosan kapcsolt oszlopon mozgott a mozgató csavar elmozdításának hatására. Ez a blokk politetrafluoretilénből (PTFE) készült. A PTFE egy olyan önkenő típusú műanyag, amely biztosítja a rendkívül szoros illeszkedést a mozgató rudak és a blokk között. Az így kialakított mikromozgató minimalizálja a vibrációt és meglehetősen stabil kialakítású. Egy teljes fordulatra a mozgató csavar 300 µm-t mozdított az elektródon lefelé, minden egyéb irányú kitérés nélkül.

4.12 Az elektród beültetése és az elvezetések kialakítása

16 Sprague-Dawley hím patkányt implantáltunk a Si-elektrod/mikromozgató rendszerrel 1.8 MAO%-os izoflurán anesztéziában. A műtét előtt állatainkat enorofloxacin-nal (10 mg/kg) kezeltük a szeptikus válaszreakciók kiküszöbölése érdekében. Állataink koponyafelszínét sztereotaxikus apparátusba fogva (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) feltártuk és megtisztítottuk. 3 db rozsdamentes acél csavart (Plastics One Inc., Roanoke, VA, USA) helyeztünk el a koponya csontba EEG regisztrálás céljából: egyet a frontális kéreg fölé (A: 4,5 mm, L: 2,5 mm), egyet a szomatoszenzoros kéreg fölé (A: -3,14 mm, L: 2,5 mm), és egyet a vizuális kéreg (A: -8,3 mm, L: 2,5 mm) fölé. A szaglógumók fölé is helyeztünk egy csavart a korona stabilizálásának céljából. A kisagy felé helyezett két csavart használtuk az elvezetéseink földpontjának. Az auditoros kéreg

állományába egy bipoláris teflon szigetelt rozsdamentes acél drótot implantáltunk az auditoros



4.2 ábra A korona kialakítása és a szövettani analízis. (A) A korona és az elvezetések átnézeti képe a befejezés előtt. Megfigyelhető a Si-elktród/flexibilis PCB kábel/mikromozgató rendszer és a Precidip konnektor, az accelerometer IC-szenzora (fekete négyszög IC PCB kicsatolással), a mikrodialitikus 'probe' számára kialakított kanülözés (mandrinna) és egy LED dióda (jobbra). (B) Az elkészült korona az operáció után. (C) A Si elektród szűrt csatornája nagyobb átnézetben és a mikrodialitikus 'probe' illusztratív ábrázolása (a 'probe' és az elektród nem egy síkban helyezkedik el). Kalib.: 1,5 mm. (D) A szűrt csatorna elhelyezkedése az agytörzsben. Kalib.: 0,8 mm. (E-G) A szűrt csatorna és astimuláció hatására 'sötétté' vált idegsejtek a kontaktusok körül. Jól kivehetők az óriás sejtek a PnO és PnC-ben elhelyezkedő kontaktusok körül, míg a PPTg állományában kisebb sejttestű neuronok váltak sötétté. Kalib.: 400 μ m

eltávolítottuk. A mikromozgatóba fogott Si-elektrod hegyét az agyfelszínhez érintettük egy általunk gyártott, speciális adapter segítségével. A beültetés 47°-os szögben zajlott (ld.: **4.2 ábra A, C és D**). Az elektrod hegyét a PPTg ventrális állományának magasságában pozícionáltuk (A: -7,1, L: 1,4 és V: -7,6) (ld.: **4.2 ábra D**). A regisztráció során az elektrod mozgását innen indítottuk a PnO-felé, miközben az elektrod középső kontaktus csoportja megközelítette a DpMe állományát. A thalamus-ból és a PnC-ből elvezetett eAP-okat a dolgozat nem részletezi. Az elektrod implantálása után a megnyitott ablakot antibiotikumos szilikonzsírral fedtük (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) annak érdekében, hogy a krónikus kísérletek folyamán az elektrod szabad mozgását biztosítsuk. Az elvezető elektrodok elhelyezése után a koponyafelszínt többkomponensű cementtel vontuk be egy vékony rétegben (SuperBond resin cement, Sun Medical Company Ltd., Moriyama, Japan). Ezután egy fedőcementtel (UniFast dentacrylic cement, GC America Inc., Chicago, USA) és polietilén műanyag elemekkel kialakítottuk a korona végső formáját (ld.: **4.2 ábra A és B**). A 12 elektrod kontaktusról (3x4db) és 4 EEG csatornáról vezettünk el állataink felépülése után. A Si-elektrodot lassan mozgattuk (60-100 $\mu\text{m}/\text{nap}$) a szövetben. Amikor az elektrodunk hegye elérte a PnC- állományát a méréseket befejezettnek tekintettük (ld.: **4.2 ábra C és D**).

4.13 Az elvezetések pontos helyének szövettani meghatározása

Amikor számításaink szerint a Si-elektrod hegye elérte a PnC-t, akkor állatainkat uretán altatásban mikrostimulációnak vetettük alá. Az elektrod kontaktusonkénti 2-2 pólusa között lévő 1-10 μA , 200-400ms hosszúságú négyszögimpulzusok képesek akut „sötét” sejt állapotba kényszeríteni a környékükön elhelyezkedő neuronokat (Czurko és mtsai., 1999; Lorincz és mtsai., 2007). Ezeket a neuronokat aztán Gallyas-féle ezüstözéssel kimutattuk (Gallyas és mtsai., 1993), így meghatározhattuk az elvezetéseink helyét a szövetben (ld.: **4.2 ábra E, F és G**).

4.14 Állataink motilitásának monitorozása a kísérletek folyamán

Állataink mozgását és általános motilitását egy 3 dimenziós akcelerométer segítségével monitoroztuk (3D accelerometer, Supertech Ltd., Pécs, HU). Az akcelerométer szenzor IC-je (ld.: **4.2 ábra A**) a beépített grafit részecskék segítségével a szöggyorsulásból adódó elmozdulást relatív Volt-értékre konvertálta. Ezt CED 1402A típusú rendszerrel digitalizáltuk és Spike2 v2.1-es szoftverrel (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK) regisztráltuk. Az akcelerométer annyira érzékenynek mutatkozott, hogy a REM alatti atóniát is nagyszerűen mutatta, sőt az EKG-ból adódó pulzushullámokat is képes volt regisztrálni a vegetatív állapot alatt.

4.13 Auditoros (AEP), vizuális (VEP) kiváltott válaszok és a megrezenési reakciók elvezetése és kiváltása

A VEP-ek kiváltására felvillanó fényingereket alkalmaztunk, amelyet egy beépített transzparens, 5 mm átmérőjű, 8 mm hosszú, LED dióda szolgáltatott (Bright Led Inc., Hong-Kong). A dióda lábait egy csatlakozóhoz forrasztottuk (ld.: **4.2 ábra A**). A fényinger retrobulbárisan érte el a retinát, így a szemgolyó irányultságától és a szemhéj pozíciójától független volt az ingerlés (Szabo-Salfay és mtsai., 2001). Vörös fényű diódát használtunk, mivel más színű fény csak nehezen terjed a szöveteken keresztül a bennük található hemoglobin miatt. Referenciaelektrodként a kiváltott válaszok esetén egy plate elektródot használtunk, amely a bőr, illetve a rágóizom közé elhelyezett, sebkapocsból levágott, 3×4 mm-es rozsdamentes acél lapocskára volt, műanyag szigeteléssel ellátott rézdróthoz forrasztva, és (a bőr felé eső részén egy ablakocskát kivéve) fogászati cementtel körbevéve. A VEP válaszokat a vizuális kéreg és a plate elektród között vezettük el. Az AEP válaszokat elvezettük a szomatoszenzoros kéreg feletti és az auditoros kéreg fölött levő elektródok között is, annak érdekében, hogy az ún. P8-as thalamikus bevezetési potenciált is regisztrálni tudjuk (Shaw, 1991) és a plate elektród között is.

Az AEP-ek kiváltására 100 dB-es koppanó hangingert alkalmaztunk, melyet egy stimulátorral (Disa Multistim, Disa Electronic A/S, Herlev, DEN) meghajtott 8

Ohm-os kétutas hangrendszerrel adtuk ki (LS 99, Schneider Electric, Ratingen, D). A megrezzenési reakciókat ugyenezen rendszerrel kiadott hangingerekkel váltottuk ki, azonban a hanginger egy 30 msec-os 300 Hz-es magasfrekvenciás zaj volt (Lee és mtsai., 1996).

A kiváltott válaszokat egy szériában 300-szor vettük föl, mely 300 egyedi válaszból 100-at átlagoltunk össze (ld.: **5.12 ábra A és B**) a kísérletek alatt. A kiváltott válaszokat Signal 4.0 programmal vettük föl (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK).

4.14 Tetrodotoxin (TTX) mikrodialitikus beadása szabadon mozgó állatokba

Mivel az idegsejtek a szövet elmozdulásaira nagyon érzékenyek, az intracerebrális lokális beadásokra a mikrodialitikus módszer a legalkalmasabb. Azért is választottuk ezt a módszert a PnO lokális bénítására, mert a mikrodialízissel való TTX beadás az irodalomban kellőképpen validált. 1 μ Mol-os TTX 500 μ m sugarú területet képes paralizálni (van Duuren és mtsai., 2007). Ezért számításaink szerint, ha a mikrodialitikus probe aktív felszínét az MnR-be implantáljuk, akkor a TTX hatékonyan bénítja a PnO-t bilaterálisan. A mikrodialízis 'probe'-okat 22 G (B. Braun Medical Inc., Betlehem, PA, USA) vénás kanül felhasználásával készítettük a szabadon mozgó kísérletek céljára módosítva. Egy kb. 10 mm dialízis rost (50 kD kivágású Terrenius HF) darab végét epoxi ragasztóval lezártuk, majd. 200 μ m külső átmérőjű „fused silica” kapillárist vezettünk bele és egy rövidebb, hasonló kapillárisal egy kimenő ágat acélcsőbe helyzetünk, melyet szintén epoxi ragasztóval zártunk. A fecskendő tű tövéénél a két kapillárisra „Y” alakban két 22 G-s acélcsövet húztunk. A csöveket fogászati cementtel rögzítettük össze. A TTX-t ACSF-ben feloldva (pH 7,2) dializáltuk 1 μ L/perc áramlási sebességgel (Syringe Pump Model 22, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). A kísérletek előtt és után a beépített kanült a probe méretével megegyező mandrinnal helyettesítettük. A dialitikus beadást 6 db patkányon végeztük el.

4.15 Az extracelluláris akciós potenciálok (eAP), az EcoG és a kiváltott válaszok elvezetése

Az eAP-okat egy Multiamp SMA-1a (Supertech Ltd., Pécs, HU) típusú erősítővel vezettük el 33 KHz mintavételezési frekvenciával majd digitalizáltuk őket (CED Micro1401, Cambridge Electronics Design Ltd.). Az adatfájlokat Spike2v.5 programmal jelenítettük meg (Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, UK). 500 Hz-8000 Hz-es tartományban engedték be az elektromos jeleinket az erősítőbe, majd „off line” alul 300 Hz és felül 6000 Hz-es szűrést végeztünk el a válogatás előtt. Az EEG-jeleket és a kiváltott válaszokat 5 KHz-es mintavételezési frekvenciával vezettük el és „off line” szűrtük 0,3-300 Hz alatt és fölött. A spektrogramokat, ráta és interspike intervallum hisztogramokat NeuroExplorer (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) programmal kalkuláltuk.

Az elvezetett eAP-ok válogatását 3D off-line analízátor programmal végeztük el (OFS/v2, Plexon Inc., Dallas, TX, USA). Principális komponens analízist végeztünk el (PCA) minden elvezetett eAP-on, melyekből kettő PCA komponens segítségével kétdimenziós pontdiagramokat ('scatterplot') rajzoltattunk a program segítségével, mely diagrammokon ún. „K-means” válogatási eljárással meg tudtuk húzni a határt az egyedi eAP-ok között (Fee és mtsai., 1996). Az egyedi eAP-k alkotta 2D pontdiagrammok eltérési küszöbét $p < 0,05$ -nél húztuk meg (MANOVA). Annak érdekében, hogy megbizonyosodjunk, hogy a válogatott eAP-ok egyetlen idegsejttől származnak, autokorrelációt számítottunk minden elvezetett neuronból (ld.: **5.8 ábra E**). Abban az esetben, ha az autokorrelogramok ún. refrakter periódusaiban egy másik eAP-tól származó „szennyeződést” találtunk, akkor az adott szakaszban az egyedi eAP-okat kézi válogatással különítettük el (Harris és mtsai., 2000).

4.16 Normalizált keresztkorrelációs (CCG) módszer ('spike' helyettesítési eljárás)

A CCG analízis egy lineáris statisztikai eljárás, mely két jel egymástól való függését vizsgálja úgy, hogy megmutatja miképpen függ az időben egyik jel előfordulása a másikéól. A módszer egy speciális alkalmazása alkalmat nyújt arra, hogy extracellulárisan elvezetett sejtpárok között indirekten tárjunk fel

excitatórikus (E) és/vagy inhibítórikus (I) monoszínaptikus kapcsolatokat (Csicsvari és mtsai., 1998; Bartho és mtsai., 2004; Fujisawa és mtsai., 2008). Egy CCG két eAP sorozatban előforduló 'spike'-ok időben eltérő előfordulását vizsgálja egymáshoz képest (kereszt-interspike intervallumok) úgy, hogy az egyik sejt eAP-ját, referenciának a másikat pedig célsejtnek tekinti. Mi az összes CCG-t [-20, +20] ms idő intervallumban számítottuk ki 1,3 ms-os bin szélességgel NeuroExplorer (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) segítségével. Ha a kapott CCG-kben [+1,3, +5,2] ms-os intervallumban kiugró csúcs (E kapcsolat), vagy ennek elmaradását (I kapcsolat) tapasztaltuk, akkor az adott CCG-t Matlab R2007b (Mathworks, Natick, MA, USA) program sigTOOL toolbox-ával (Lidierth, 2009), ún. 'spike' helyettesítési eljárással normalizáltuk. A normalizálást olyan sejtpár esetében, melyek CCG-jai valószínűsítik a monoszínaptikus kapcsolatot, annak érdekében kell elvégezni, hogy kiküszöböljük a rövid távú korrelációk hosszú távon való korrelációkat befolyásoló effektusát, mely hatás statisztikailag (arteficiálisan) monoszínaptikusnak tekinthet egyébként nem kapcsolt sejteket is (Csicsvari és mtsai., 1998; Fujisawa és mtsai., 2008). A normalizálás ún. 'spike' behelyettesítő módszere a célsejt eAP-jait [-5, +5] idő intervallumban függetlenül, random módon 1000-szer visszaírja ('elszórja') a referenciasejthez képest. Az eljárás kizárja a CCG szenzitív periódusából a véletlenül egybeeső eAP-ok artefaktumait úgy, hogy a CCG-okon a helyettesített értékek variációjának kiterjedésére (ld.: **5.8 ábra D**) két küszöböt tudunk felállítani 97%-os konfidencia intervallummal (értékek száma/bin). Ezek után, ha egy sejtpár CCG-inek kiugró csúcsa (E esetben) vagy 'öble' (I esetben) háromszorosan meghaladta (I esetben háromszorosan elmaradt) a helyettesített (randomizált) eAP sorozat varianciája (97%-os) középértékének háromszorosát (+SD) ($p < 0.0013$, normál eloszlással), akkor a kapcsolatot monoszínaptikusnak tekinthettük (Marshall és mtsai., 2002). Azokat az eAP-okat, amelyeket egy elektród kontaktusról vezettük el a válogatás ('sorting') alatt ún. vak periódust használtunk annak érdekében, hogy az auto- és keresztkorrelogramok szenzitív periódusából (0 bin) kizárjuk az előforduló ún. szennyező korrelációkat. Az óriás sejtek extrém széles eAP-jai nem tették lehetővé a CCG analízis használatát, ugyanis két széles, átfedő

'spike' alak egybeesése pont a CCG szenzitív periódusát tette „tönkre” (eAP torlódás). Az óriás sejt - óriás sejt interakciók kivizsgálására ezért a jövőben matematikai dekomponációs algoritmust kell használni.

A monoszinaptikus kapcsolatok erősségének állapotfüggő megváltozásait a CCG csúcsának (vagy ennek hiányának) és a randomizálás adta küszöbnek a különbségéből számoltuk ki állapotonként (SWS/REM/W) (Fujisawa és mtsai., 2008).

4.17 A monoszinaptikus sejtpárok effektív konnektivitásának (EC) állapotfüggő és dinamikus megváltozása

Mivel a CCG analízis egy általunk kijelölt időintervallum átlagolt értékeit használja fel, nem alkalmas egy sejtpár összekapcsoltságának nem stacionárius megváltozásainak követésére. Az EC kivizsgálására ún. kísérő stimulus körüli idő hisztogramokat használtunk (Joint Peristimulus Time Histogram, JPSTH) (Aertsen és mtsai., 1989). A JPSTH-kat NeuroExplorer (Plexon Inc., Dallas, TX, USA) programmal számítottuk ki, az adott szakaszhoz igazított bin szélességgel (ld.: **5.9 ábra B, C és D**). A JPSTH mátrix (a mátrix bin-jeinek intenzitása az eAP-ok egybeesésnek mértékével egyenesen arányos) a két sejtpár 'spike' sorozatából kialakított PSTH-k kombinálásából alakul ki. A JPSTH-okat egy adott stimulus kiváltotta 'spike' sorozatok összefüggésének vizsgálatára fejlesztették ki, de jellegükben alkalmasak két stimulus nélküli sejtpár effektív konnektivitásának időbeli követésére is (Nadasdy és mtsai., 1999; Sirota és mtsai., 2003). A JPSTH mátrix paradiagonális átlójában az időben eltoló CCG-k coincidencia értékei (PCTSH) vizsgálják azt a rövid távú 'spike' átviteli hatékonyságot (referencia- célsejt), amelyet az előző fejezetben részleteztünk (ld.: **5.9 ábra B, C és D**). A JPSTH szintén alkalmaz normalizációs lépéseket annak érdekében, hogy a statikus CCG analízishez hasonlóan, kiküszöbölje az indirekt külső hatások statisztikai hatását az EC kimutatásakor (reziduális korrelációk kizárása). Az eljárás az alap JPSTH mátrixot egy speciális, ún. csúsztató algebrai módszerrel módosítja, mely után a mátrixhoz szórást is rendel. Az eljárás részletesebb leírását az irodalomban megtalálhatjuk (Gerstein

és Perkel, 1969; Aertsen és Gerstein, 1985; Aertsen és mtsai., 1989; Ito és Tsuji, 2000). A kiszámított mátrix színek kódja az időben mutatja meg az adott sejtpár kapcsolatának EC-át (piros: erős kapcsolat, kék: gyenge kapcsolat). Az eljárás egyik hátránya az, hogy a kiszámított mátrix értékeit lehetetlen kvantifikálni.

4.18 Állataink fiziológiai monitorozása az fMRI felvételek alatt

Az FC MRI vizsgálatokat (N=12) egy Bruker 9,4 T (9,4 Tesla) Biospec Avance 94/31 (AVANCE Bruker Corp., Billerica, MA, USA) kisállat fMRI készülékkel végeztük el a Medical College of Wisconsin (Milwaukee, WI) saját agyi képalkotó centrumában (Center for Imaging Research, MACC Fund Research Center). A felvételek *Matt Runquist* és *Shi-Jiang Li* mérnökök közreműködésével készültek. Az fMRI technológia kifejezéseinek magyarosítása sajnos még nem történt meg, vagy egyszerűen lehetetlen, így a dolgozatban jellemzően az eredeti angol kifejezések szerepelnek. A kérdéses kifejezéseket és köznevesült rövidítéseket a következő összefoglaló szótárban lehet megtalálni: <http://www.acr.org/Quality-Safety/Resources/MRI-Glossary>.

Három patkányt intravénásan (vena femoralis) altattunk propofol-lal (2,5 mg/tskg/óra) (ld.: **5.16 ábra A**). Kilenc másik állatot izofluránban altattunk (1,1-1,3 MAO%) (ld.: **5.16 ábra B**). Az altatott patkányok egy Bruker fókuszáló tekercsben (T10325) kerültek az fMRI mágneses terébe egy házilag épített G-10-es üvegszál bölcsőben. Az állatok koponyája fölé egy ún. kiegyenlítő tekercs (T9208) is került mely biztosította az egyenletes mágneses teret. A stimuláció előtt és után ún. anatómiai MRI képalkotást végeztünk el, amely azért volt szükséges, mert a stimuláció hatására az állat helyzete megváltozhatott és ezt ún. „off line” mozgáskorrekcióval korrigálni kellett. Az anatómiai felvételekhez ún. rövid refókuszációs eljárást alkalmaztunk (Rapid Acquisition with Refocusing Echoes, RARE) a következő paraméterekkel: TR (ismétlési idő)=2500 ms, TE (Idő az 'echo'-ig) =8 ms, átlaglások száma=2, FOV (vizsgálati osztás)=35mmX35mm, Mátrix méret= 256X256, Szelet vastagság=1mm, Szeletek száma=15 axiálisan. Az anatómiai MRI képeket 2 speciális

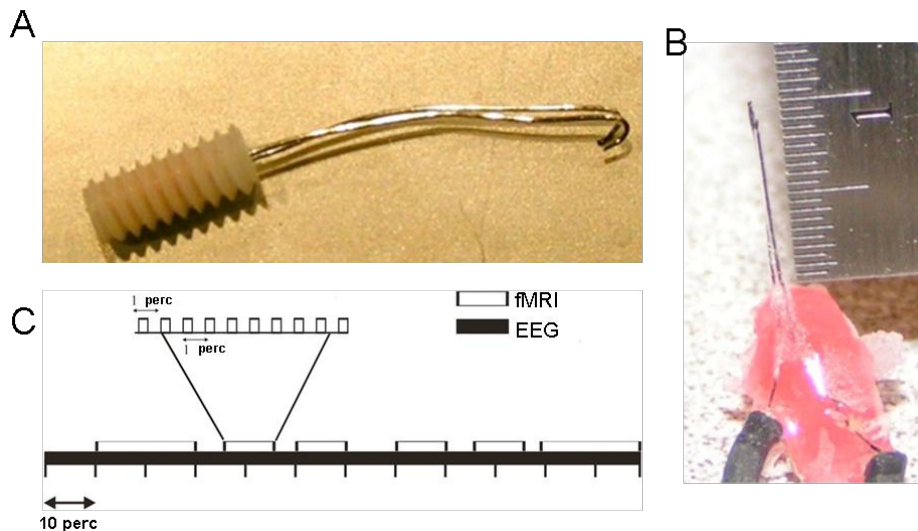
programpárral állítottuk össze (Oxford Centre for Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain's (FMRIB) és Linear Image Registration Tool (FLIRT)).

A kísérlet folyamán az állatok fiziológiai monitorozása folyamatos volt, az állatok állandó testhőmérsékletét (37°C) egy cirkulációs hőkiegyenlítő rendszerrel biztosítottuk (Meditherm-III, Gaymar Industries, Orchard Park, New York, USA). Állatainkat intubáltuk és egy mechanikai lélegeztetővel (MRI-1, CWE, Ardmore, Pennsylvania, USA) légzésszámukat 55 és 65 között stabilizáltuk a kísérletek folyamán. A be és kilélegzett levegő O_2/CO_2 arányát folyamatosan monitoroztuk (POET-IQ2, Criticare Systems, Waukesha, Wisconsin, USA) és ha az érték elmozdult a lélegeztetett gázösszetétel ($70/30 \text{ N}_2/\text{O}_2$) megváltoztatásával stabilizáltuk. Az állatainkon véres vérnyomást (Model 1025, SA-Instruments, Stony Brook, New York, USA) és vér oxigénszintet (Model 8600V, Nonin Medical, Plymouth, Minnesota, USA) is mértünk a képalkotás során. Ezen értékek stabil szinten tartása nélkül nem lehetne megbízható BOLD aktivitás szintet regisztrálni. Állataink fiziológiai paramétereinek monitorozását és automatikus beállítását egy házilag módosított szoftver látta el (Windaq Pro, DataQ Instruments, Akron, Ohio, USA). Az állatokat pancuronium bromid-dal kezeltük intravénásan (izomrelaxáns, 2mg/tskg/óra).

4.19 Az FC fMRI képalkotás és a PnO stimuláció

A fMRI-BOLD képalkotásokat elvégeztük a PnO stimuláció előtt ún. pihenő helyzetben (kontrol) és a stimuláció alatt is EPI (Echo Planar Imaging) technikával: $\text{TR}=2000\text{ms}$, $\text{TE}=19\text{ms}$, $\text{NA}=1$, Mátrix méret= 96×96 , $\text{NR}=300$, továbbá minden képalkotási szakasz 10 perces időtartamban zajlott ugyanolyan síkban, mint ahogy az anatómiai térképezés történt. A 10 perces szakaszban összesen 5 perc futamidejű fMRI-BOLD képalkotás történt úgy, hogy a PnO stimulációja után indítottuk a térképezést (30s) (ld.: **4.3 ábra C**). A képalkotási szakasz (30s) után 30 másodperccel stimuláltuk 3 másodpercig a PnO-t 300Hz-es, 5-7V-os négyszögimpulzusokkal. Az így kialakított átfedő kísérleti konstelláció (ld.: **4.3 ábra C**) kihasználta a PnO stimulációjának elhúzódo hatását (ld.: **5.15 ábra B**) a

képalkotás folyamán. Mivel 5 perces összidejű fMRI 'szken' darabonként volt mintavételezve, szeletenkénti időkorrelációt végeztünk „off line”, hogy kiküszöböljük az ún. lineáris 'drift' jelenséget. Az fMRI FC analízisét *Xiping Liu* radiológus segítségével végeztük el. A kísérlet alatt mért voxelenkénti BOLD aktivitásokat utólagos mozgás korrekcióval visszaállítottuk az anatómiai képnek megfelelően, ha erre szükség volt. Az BOLD fluktuációkat 0 és 0,08 Hz között leszűrtük. Az EPI képalkotásokat ún. 'FMRIB's Linear Image Registration Tool (FLIRT)' programmal végeztük el és ún. 'Analysis of Functional NeuroImages (AFNI)' programmal elemeztük őket tovább és hasonlítottuk aztán őket össze a RARE anatómiai térképekkel. Az általunk használt BOLD hemodinamikus modellezés megtalálható az irodalomban (Pawela és mtsai., 2009).



4.3 ábra Az FC fMRI és a PnO stimuláció összehangolása. (A) A frontális kérgi bipoláris elvezető (EEG) elektróda speciális, antimágneses platinából készült. (B) Az általam készített bipoláris ingerlőelektród 7 μ m vastagságú Laurent-carbon szénzál kötegek üvegszigetelésével lett kialakítva. (C) Az átfedő kísérleti konstelláció, amely kihasználja a képalkotás során, hogy a PnO ingerlés hatásra perzisztens deszinkronizáció alakul ki (Liu, 2012).

Minden állaton belül a funkcionális konnektivitás (FC) (Friston és mtsai., 1993; Friston, 2011) kiszámolásához - *a priori* - a Meynert-féle mag (Nucleus Basalis Meynerti, NBM) magjában elhelyezkedő voxeleket (N=6) választottuk ki ún. forrásnak ('seed'), amelyekhez az analízis során az összes többi voxelt egy

fMRI analízisre kidolgozott, ún. ortogonális PCA analízissel keresztkorreláltuk (Pawela és mtsai., 2009; Friston, 2011). A PCA analízist egymástól függetlenül minden voxelen lefutattuk a forrás voxelekhez képest. A FC mérése alkalmasabb egymástól távolabb levő anatómiai struktúrák funkcionális összekapcsoltságának analízisére, mint az effektív konnektivitás (EC), mely referenciának az egész agy összes voxelét használja (Friston, 2011). A korrelációs koefficiens értékeken Fischer-féle Z transzformációt hajtottunk végre a PCA analízis keresztkorrelációi alapján. Az állatok átlag FC fMRI aktivációs térképeit egymintás t-teszttel generáltuk úgy, hogy a pozitív és negatív CC értékekből csak a szignifikánsan eltérőket ábrázoltuk (a FC küszöböt $p < 0,05$ értékre állítottuk be).

4. 20 Statisztikai módszerek

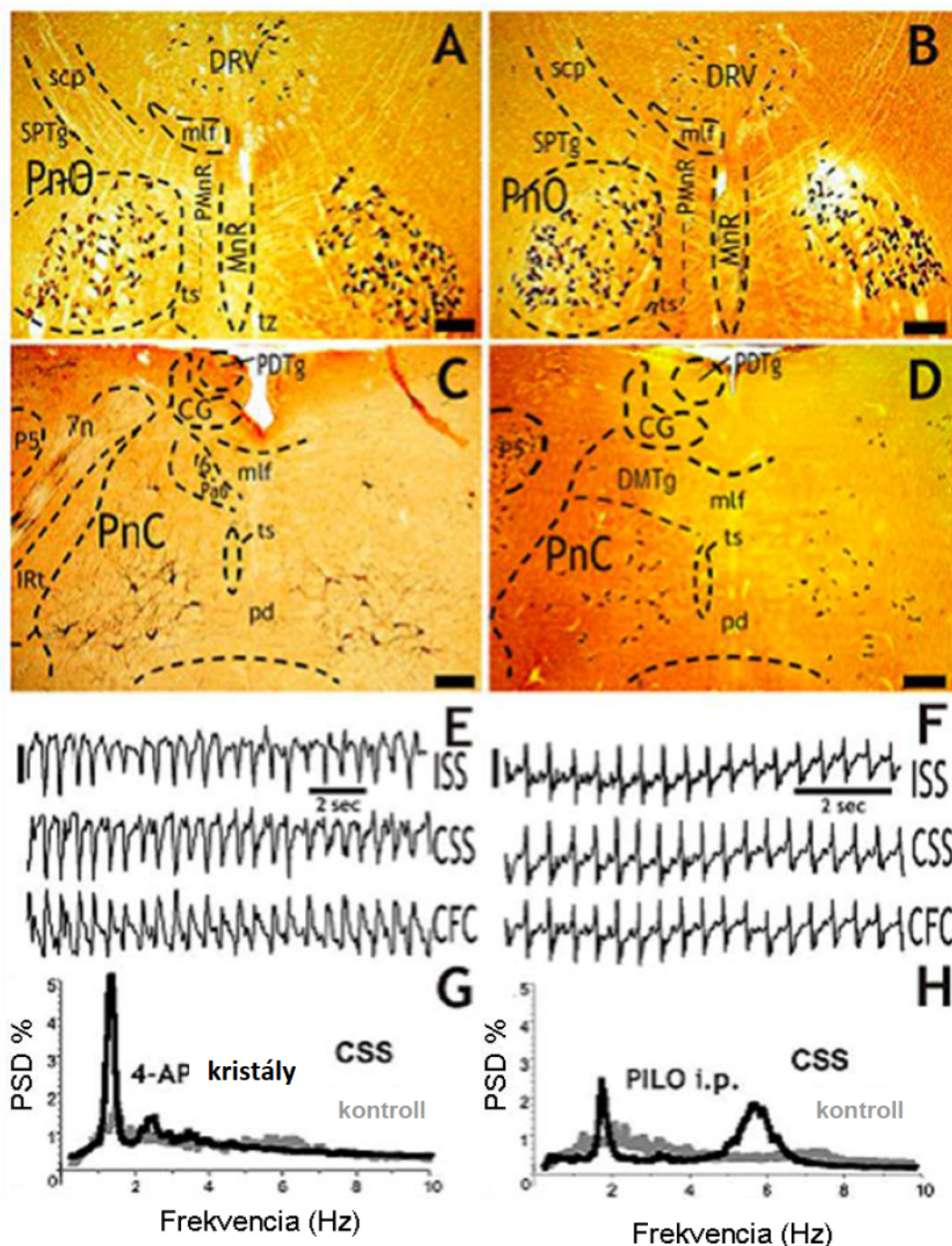
A kísérletek eredményeinek statisztikai elemzéseit IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Chicago/Delaware, IL, USA) szoftverrel végeztük el és Origin 9.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, USA) programmal ábrázoltuk őket.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

5.1 A status epilepticus alatt szelektíven sérül a gigantocelluláris rendszer

Előtanulmányainkból kiderült, hogy a fokális-kortikális rohamok generalizációjakor két jól körülírható neuronpopuláció sérül hisztopatológiailag. Az egyik a hippocampus interneuronjai és a másik az ARAS óriás sejtjeinek hálózata. Ez új adatnak számított hiszen közismert, hogy a hippocampusban már rövid epilepsziás rohamok is képesek patológiás állapotba kényszeríteni idegsejteket, melyeket a nagyon érzékeny Gallyas-féle 'sötét'-sejt ezüstözés képes kimutatni (Covolan és mtsai., 2000; Poirier és mtsai., 2000). Egyenlőre nem bizonyított, hogy a hídi ARAS gigantocelluláris sejtjei részt vesznek-e az epilepszia generalizációjában azonban néhány elektrofiziológiai adat utalhat arra, hogy fontos szerepük van a *status epilepticus* progressziójában (Peterson, 1995; Elazar és Berchanski, 2000; Manjarrez és mtsai., 2001). Jóllehet kutatócsoportunk kimutatta a hídi óriás sejtek szelektív sérülését a *status epilepticus* (SE) alatt, ennek szisztematikus kivizsgálásához további kísérletek szükségesek.

Annak érdekében, hogy megállapítsuk, hogy az ARAS gigantocelluláris állományának sérülése nem csupán a szomatomotoros kéregre helyezett **4-AP kristály** okozta transz-szinaptikus excitotoxicitás járulékos következménye volt egyéb szisztémásan adott epileptogén anyagokkal is megvizsgáltuk a jelenséget. Nevezetesen intraperitoneálisan (i.p.) adott **pilocarpin** (PILO), **4-AP** és a nyakizomba injektált (inj.) **kainát** (KA) epilepszia modellekben. Három óras túlélési időben vizsgáltuk állatainkat miközben az SE Treiman-féle fázisait EEG-vel monitoroztuk (Treiman és mtsai., 1990; Treiman, 1995). Ez fontos volt annak megállapításához, hogy állataink elérték az SE kései állapotát. Számos tanulmányban kiderült, hogy az előzetes, rövid parciális rohamok képesek



5.1 ábra Óriás ‘sötét’ sejtek a PnO-ban (A és B) és a PnC-ben (C és D) 4-AP-kristály fokális kortikális applikációja (A és C) és pilokarpin i.p. beadása (B és D) után. Látható, hogy a PnO és a PnC hasonlóan érintett volt mindkét esetben. Fontos látni azonban, hogy a PnO-ban levő óriás sejtek voltak nagyobb mértékben érintettek a Treiman-féle IV-es fázis létrejöttkor, melyet az EEG-k (E és F) és teljesítmény spektrumaik (G és H) jól tükröztek (ld.: a PSD csúcsokat 1 –és 2Hz között), ugyanis ez a fázis jellegzetes lassú-hullámú paroxizmális aktivitással jellemezhető. A PSD-k szürke kontrolljai 30 perces szakaszból származnak a farmakonok beadása elől. Az SE alatti PSD-k 1 óra EEG-ből származnak. (folytatás ld.: következő oldal)

toleranciát kialakítani a visszatérő, elhúzódó generalizált rohamok kialakulása és az általuk okozott sejtpusztulás ellen, mely jelenséget 'sötét' sejt ezüstözéssel is kimutattak (Covolan és Mello, 2006). Ogita és munkatársai bizonyították, hogy az előzetesen adott 4-AP kivédi a KA indukált a sejtpusztulást (Ogita és mtsai., 2005). Ezt a jelenséget szerettük volna kihasználni annak eldöntésére, hogy az ARAS óriás sejtjeinek van-e szerepe a rohamok generalizációjában, ugyanis ha az epilepsziás tolerancia kialakításának ellenére is megfestődnek ezek a sejtek - a Gallyas-féle ezüstözéssel - azokban az esetekben, melyekben a prekondíció ellenére SE alakult ki, akkor ez a rohamgenezisben való aktív szerepükre utalhat.

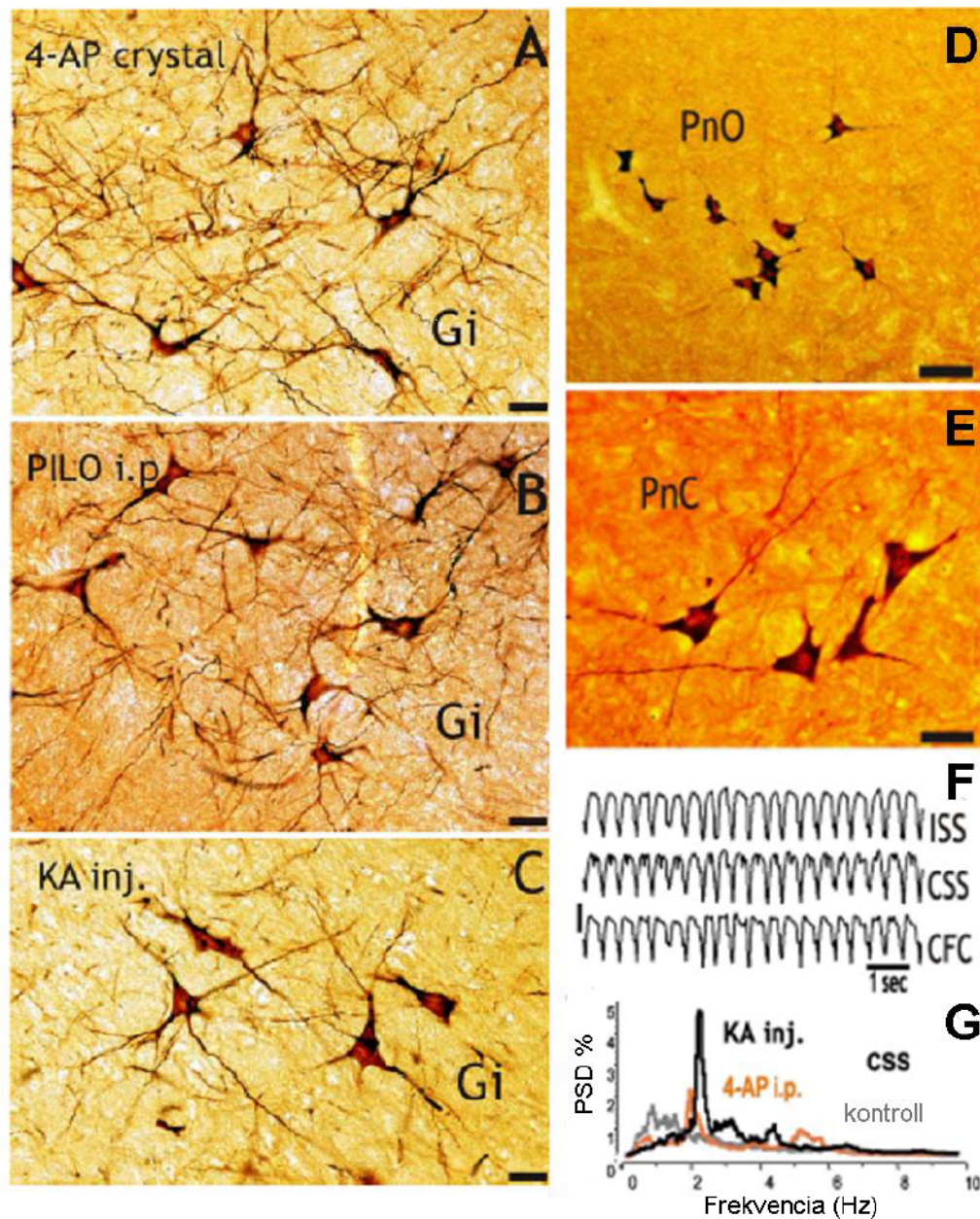
Fokális 4-AP kristály hatására a 4 vizsgált eset közül 3 patkány jutott el az SE kései stádiumába (ld.: **5.1 ábra E és G**). Mindhárom esetben megfigyeltünk 'sötét' sejteket az ARAS magjaiban (PnO, PnC és Gi) (ld.: **5.1 ábra A és C, 5.2 ábra A és 1. táblázat**). Az az állat, amelyik nem lett SE-os nem mutatott sötét sejteket (ld.: **1. táblázat**).

4-AP intraperitoneális beadását 4 patkányban végeztük el és közülük az a kettő, amelyik SE-ba jutott – a kristályos fokális modellel egybevéve - mutatott 'sötét' óriás sejteket, főképp a PnO-ban, mely nem volt megfigyelhető a nem generalizálódó másik két esetben (ld.: **1. táblázat**).

Pilokarpin szisztémás (i.p.) beadását 6 állatban végeztük el és közülük 5 került SE-ba (ld.: **5.1 ábra F és H, 5.3 ábra C és D**). Mind az öt állat PnO-ában (ld.: **5.1 ábra B, 5.3 ábra B és 1. táblázat**), PnC-jében (ld.: **5.1 ábra B és 1. táblázat**) és Gi-ában (**5.2 ábra B és 1. táblázat**) a 'sötét' óriás neuronok megfigyelhetők voltak.

4.1 ábra folyt.: Rövidítések: ISS és CSS: ipszi- és kontralaterális szomatoszenzoros kéreg, CFC: kontralaterális frontális kéreg, 6: n. abducens, 7n: n. facialis és gyökere, CG: centrális szürkeállomány, DRV: n. raphe dorsalis, partio ventralis, IRt: n. reticularis intermediális, mlf: fasciculus medialis longitudinalis, MnR: n. raphe medianus, P5: zona peritrigeminalis, Pa6: n. paraabducens pd: predorzális köteg, PDTg: n. posterodorsalis tegmentalis, PMnR: n. raphe paramedianus, PnC: n. reticularis pontis caudalis, PnO: n. reticularis pontis oralis scp: pedunculus supcerebellaris, SPTg: n. subpeduncularis tegmentalis, ts: tractus tectospinalis, tz: trapéztest
Kalib: A, B, C és D = 400 µm, E és F = 200 µV.

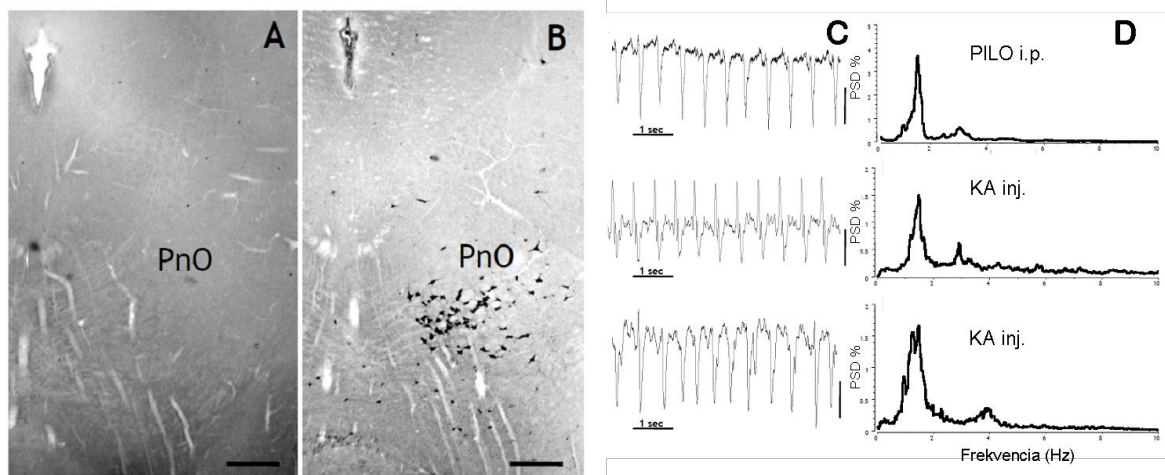
(Baracska és mts., 2009)



5.2 ábra 'Sötét' sejtek a Gi-ben a különféleképp indukált SE végső stádiumában (A, B és C) és a hídi ARAS magokban (PnO és PnC) (D és E) toleranciás prekondíció (4-AP) ellenére kialakuló KA-indukált SE-ban (F és G). A sárga PSD az előző napi 4-AP kezelés EEG teljesítményét mutatja. Látható, hogy a másnapi KA inj. SE-t okozott (fekete PSD). Mindkét PSD 1órás szakaszból készült, ellenben a szürke kontroll 30 perces szakaszból közvetlenül a KA beadás előtt. Rövidítések: ISS és CSS: ipszi- és kontralaterális szomatosenzoros kéreg, CFC: kontralaterális frontális kéreg. Kalib.: A, B és C = 80 μ m, D= 100 μ m és E = 50 μ m, F= 300 μ V

(Baracska és mts., 2009)

Kainátot 4 esetben **injektáltunk** a patkányok nyakizmába. Közülük kettő lett SE-os (ld.: **5.3 ábra C és D**), melyekben sikeresen ezüstöztünk 'sötét' idegjesteket az ARAS magokban (ld.: **5.2 ábra C és 1. táblázat**). A másik kettő nem lett epilepsziás, de a Racine-féle magatartási skálán elérték a harmadik szintet és egyikükben megfigyelhető volt néhány 'sötét' neuron a PnC-ban (ld.: **1. táblázat**).



5.3 ábra Negatív kontroll (A) és 'sötét' óriás idegsejtek a rostrális PnO-ból (B) PILO hatására. Reprezentatív EEG szakaszok (C) és ezek első órájának teljesítményspektruma (D) a generalizált konvulzív SE alatt PILO és KA hatására. Kalib.: A és B = 500 μm, C = 200 μV.

(Baracska és mts., 2009)

Azokban az állatokban, melyekben az i.p. –an adott 4-AP vagy pilokarpin nem okozott SE-t, másnap KA inj.-val próbáltunk SE-t kialakítani. Ebben a **toleranciás** modellben az állatok a második nap kiváltott SE hatására a hippocampusukban jelentősen csökkent a patológiás idegsejtek száma, ugyanakkor ez az ARAS magjaiban nem volt igaz, itt következetesen megjelentek az SE előrehaladott fázisában (ld.: **5.2 ábra D – G és 1. táblázat**) (Baracska és mtsai., 2009). A négy állat közül - melyeket vizsgáltunk – két 4-AP-t és két PILO-t kapott a másnapi KA inj. előtt. Közülük egyik állat mindkettő anyagból kapott a KA inj. előtt (ld.: **1. táblázat**). A toleranciás prekondicionálás ellenére a 'sötét' óriás sejtek a PnO-ban halmozottan (ld.: **5.2 ábra D**), de a PnC-ban is megfigyelhetők voltak (ld.: **5.2 ábra E**).

1. Táblázat: A fokális kortikális és a szisztémás epilepszia modellek összehasonlítása 3 óras túlélésnél

4-AP kristály (n = 4)					4-AP i.p. (n = 4)					Pilocarpin (n = 6)					Kainát (n = 8)				
i.d.	PRF DN	Bhv.	SE	EEG	i.d.	PRF DN	Bhv.	SE	EEG	i.d.	PRF DN	Bhv.	SE	EEG	i.d.	PRF DN	Bhv.	SE	EEG
ac1	-	3	-		ai1	-	3	-		pi1	-	3	-		ka1 _E	+++	4	+	5
ac2	++	5	+		ai2	-	3	-		pi2	+	5	+		ka2 _E	+	3	-	3
ac3	+++	5	+		ai3	++	5	+		pi3	+++	5	+		ka3 _E	+++	4	+	5
ac4 _E	+++	5	+	5	ai4	+++	5	+		pi4 _E	+++	5	+	5	ka4 _E	-	3	-	2
										pi5	+++	5	+						
										pi6 _E	+++	5	+	5					
					aki		2	-		pk1		2	-		aki	++	5	+	
					ak2 _E		3	-	1	pk2		2	-		ak2 _E	+++	5	+	5
															pk1	+	4	-	
															pk2	++	5	+	

i.d.: egyedi állatjelölések, PRF DN: a 'sötét' sejtek (Dark Neuron, DN száma a hídi formato reticularisban (Pontine Reticular Formation, PRF), Bhv: a Racine-féle magatartási skála (behavior, Bhv) értékei az epilepszia progressziójakor, Se: SE jelenléte (+), vagy elmaradása (-), Treiman- féle EEG fázisok az SE szukcessziójában

A DN-ok relative számát 6 db 60 µm-es metszet átlagából számítottuk külön-külön a PnO, PnC és a Gi saját metszetfelületére vonatkoztatva. A szemikvantitatív skála a következő volt: +: 1-5 DN; ++: 5-15 DN; +++: 15-30 DN

(Baracska és mts., 2009)

A tolerancia hatására, szerte az agyban, a másodlagosan kiváltott SE hatására kialakuló 'sötét' sejtek száma csökkent, ugyanakkor a klasszikus ARAS magokban az SE Treiman-féle 4. és 5. fázisában (Treiman, 1995) az óriás 'sötét' sejteket a tolerancia ellenére minden esetben megtaláltuk. Ez a jelenség a hídi *formatio reticularis* aktív szerepére utal a rohamok generalizálásában.

5.2 Vajon az SE kései fázisában létrejövő lassú hullámú periodikus epileptiform kisülések a hídi óriás sejtek funkcionális hanyatlásának következményei?

Megállapíthatjuk, hogy az SE folyamán a hídi gigantocelluláris rendszer az SE kiváltásának módjától függetlenül szenvedett szelektív sérülést. Nem teljesen ismeretlen az irodalomban, hogy a hídi *formatio reticularis* részt vesz az epilepsziás progresszió előidőzésében, vagy fenntartásában (Elazar és

Berchanski, 2000; Raisinghani és Faingold, 2005). Ezen kívül az is bebizonyosodott, hogy a régió antiepileptogén lókuszt (Manjarrez és mtsai., 2001; Shehab és mtsai., 2005; Shehab és mtsai., 2007). Humán fMRI és PET adatok is kimutatták a híd érintettségét az epilepsziás rohamok által (Federico és mtsai., 2005; Joo és mtsai., 2006; Tae és mtsai., 2007).

Állatainkat a Treiman-féle EEG skálába soroltuk be, amely az elhúzódozó epilepsziás esetek fázisait osztályozza a jellegzetes EEG képük alapján (Treiman és mtsai., 1990; Treiman, 1995). Ennek a skálának prediktív ereje is van az SE szukcessziójának tipizálásával. Az SE előrehaladott stádiumaiban lassú hullámmal jellemezhető, ritmikus, periodikus epileptiform kisülések figyelhetők meg (ld.: metodika). Ezeket a periodikus epileptiform kisüléseket Treiman egy korai és egy kései típusra osztja. A kései periodikus epileptiform kisülések egy viszonylag lapos EEG háttérben körülbelül 1,5 Hz-nél adnak kiugró teljesítményt a PSD-on. A kései periodikus epileptiform kisülések szintén egy viszonylag lapos háttérben, de már polimorfikusan jelentkeznek 1 Hz-nél, vagy 1 Hz alatt. Az általunk három órás túlélésben vizsgált állatok agyában megjelenő óriás gigantocelluláris hálózat a Treiman-féle skálának ezen előbbi, 2 és 1 Hz közötti aktivitással jellemezhető stádiumában szenvedett szelektív sérülést. Érdekes módon egy tanulmány pont ebben a fázisban figyelt meg fokozott glükóz felhasználást a hídban (Handforth és Treiman, 1995). Hipotézisünk szerint az ebben a fázisban kifejlődő speciális lassú hullámú aktivitás a hídi óriássejtes hálózat funkcionális hanyatlásának következménye. Úgy gondoljuk, hogy ezek a hídi óriás idegsejtek a *formatio reticularis*-ban a parciális ismétlődő rohamos fázis alatt intenzív excitációt fogadnak, mely arra kényszeríti az ARAS-t, hogy ezen aktivációs hatásokat generalizálja. Az agytörzsnek a parciális rohamok generalizálásában betöltött szerepéről számos humán adat is rendelkezésre áll (Kohsaka és mtsai., 1999; Kohsaka és mtsai., 2001; Kohsaka és mtsai., 2002). Ez a fokozott excitotoxikus stressz az epilepszia még nem generalizált fázisainak folyamán valószínűsíthetőleg patológiás állapotba kényszeríti az ARAS óriás sejtjeit, melynek a rendkívül szenzitív Gallyas-féle ezüstözés már korai fázisban kimutat. Úgy gondoljuk, hogy ezen sejtek sötét állapotba kerülésük folyamán

beszűntetik aktivitásukat és nem képesek válaszolni a szinaptikus, szenzoros aktivációkra. Mivel ezek a sejtek az ARAS hatások fő effektorai, ezért úgy gondoljuk, hogy sérülésükkel az ARAS nem képes aktiváló hatását kifejezni az agykéreg felé és ennek folyamányaként jelenik meg az EEG-n ez a speciális lassú hullámú aktivitás. Fontos visszaemlékeznünk, hogy a vegetatív, vagy komatikus állapotra hasonló mintázat jellemző. Az SE Treiman-féle 4. és 5. fázisában is gyakran áll be komatikus állapot mely halálhoz is vezethet (Drislane, 2006). Az SE alatt beálló kómának és az egyéb okok miatt kialakuló tudatvesztéssel járó (komatikus) állapotoknak ezek szerint az ARAS óriás sejtes hálózatának sérülése, egy lehetséges közös oka.

5.3 Szabadon mozgó állatok PnO-jában levő óriás sejtek aktivitása 'arousal' függő.

Az előző fejezetekben ismertetett eredményeink felvetették, hogy az SE következtében létrejövő kómáért a hídi gigantocelluláris hálózat szelektív sérülése lehet felelős. Mivel a lassú hullámú ritmikus epileptiform kisülésekkel járó állapothoz köthető kómában, az ARAS magjain belül leginkább a PnO nagysejtes állománya volt érintett, azt feltételeztük, hogy ezen hálózat különös jelentőséggel bír az 'arousal' közvetítésében és a tudatos állapot fenntartásában. Elhatároztuk, hogy az általunk erre a célra kifejlesztett speciális Si-alapú elektród/mikromozgató rendszerrel (ld. metodika), egy speciális ferde célzás segítségével, szimultán próbálunk meg egysejt aktivitásokat (eAP) elvezetni az ARAS kitüntetett magjaiból (DpMe, PnO) az alvás-ébrenléti ciklus alatt.

Fontos előre tisztáznunk, hogy a fiziológiás alvás-ébrenléti ciklust tekintve, ebben a dolgozatban a lassú hullámú alvás (SWS) és az ébrenlét (W) állapotának összehasonlítására fektettünk különös hangsúlyt. Ennek oka, hogy a REM-alvás állapota az 'arousal' szempontjából olyannyira speciális, hogy véleményünk szerint ez az alvási fázis nem alkalmas egy adott sejtpopuláció 'arousal' függésének vizsgálatára. Ugyanakkor, mivel a PnO az LDT és PPTg kolinerg REM indukciós hatásának egyik fő közvetítője, érdekelt minket, hogy a

PnO egysejt aktivitásainak szintjén tetten érhető-e ez a kolinerg indukciós hatás? Fontos azonban megjegyeznünk, hogy a dolgozat szempontjából ezt a kérdést csupán melléktémának tekinthetjük.

Úgy gondoljuk, hogy az alvás-ébrenléti ciklusban a NREM-alvás (SWS) tekinthető a legkevésbé, míg az ébrenlét - a tudatos állapottal összefüggésben – a leginkább arouzábilisnak tekinthető. Emiatt annak eldöntésére, hogy az ARAS magjaiban levő idegsejt populációk valamelyike *'arousal'* függő, vagy indukáló-e, ezen két állapot összehasonlítása alkalmas. Akkor tekinthetünk egy adott idegsejtet *'arousal'* függőnek, ha tüzelési rátájának frekvenciája az állat magatartási szintjén (akcelerométer) és az EEG szintjén (deszinkronitás) mérhető aktiváció alatt a legmagasabb. Evidens módon ezek az aktivitások fiziológias állapotban az alvás-ébrenléti ciklusban ébrenlét alatt magasak.

Mircea Steriade (1924-2006) fejbefogott macskákban az MRF sejtjeiről (ekv.: DpMe) bebizonyította, hogy a thalamus intralaminális magjain keresztül aktiválja az agykérget (Steriade és Hobson, 1976). Számos kísérlet feltételezi azt, hogy macskákban a DpMe az éberség fenntartásában úgy játszik szerepet, hogy a lassú hullámú alvás kezdetekor megjelenő orsó aktivitást képes megakadályozni a thalamusz generátor struktúráiban (ld.: bevezetés) (Steriade és mtsai., 1982). Szeretnénk hangsúlyozni, hogy macskákban a lassú hullámú alvásnak ehhez az iniciális fázisához társuló orsó (Slow Wave Spindle)- aktivitást a mi kísérleti állatainkban (patkány) még nem sikerült megfigyelni. Az alvás-ébrenléti ciklus szabályozásának szempontjából fontos, a bevezetésben is említett területet a rosztrális PnC-t, (ekv.: m(P)FTG) szintén macskákban vizsgálták meg az alvás-ébrenléti ciklus során eAP-ok (Extracellular Action Potentials, eAP) elvezetésével fejbefogott (McCarley és Hobson, 1971; Hobson és mtsai., 1974b; Hobson és mtsai., 1974a) és szabadon mozgó állapotban is (Vertes és Miller, 1976; Vertes, 1977, 1979). Ahogy már említettük, a kísérletek a terület REM indukciós szerepét hangsúlyozták, ugyanakkor felvetették, hogy ugyanitt vannak olyan idegsejtek, amelyek ébrenlétkor aktívak, különösképpen az akaratlagos mozgások inicializálódásakor (ld.: **1.20 ábra B**) (Vertes, 1977, 1979). Nagyon fontos megemlíteni, hogy ezekben a munkákban az eAP-ok formája alapján nem tettek

kísérletet a különböző sejttípusok osztályozására. Az az egy vizsgálat, amelyik megpróbálta elkülöníteni a gigantocelluláris sejteket a körülötte lévő egyéb sejtcsoportoktól viszont nem az akciós potenciálok formáját, hanem csupán amplitúdóját vette alapul (Vertes, 1977).

Több csatornán szimultán elvezetett 'unit' aktivitást az ARAS magjaiból ismereteink szerint még soha senki nem kísérelt meg mérni szabadonmozgó állapotban. Azt, hogy az ARAS magjai közül a DpMe-t és a PnC-t vizsgálták, az a kényszer is befolyásolta, hogy a PnO fölött helyezkedik el az ún. kisagy sátor, amely különösképpen nehezé teszi ennek a területnek a mikroelektrofiziológiai vizsgálatát. Az általunk kifejlesztett rostro-caudalis irányú ferde behatolás azonban sikerrel kecsegtetett arra nézve, hogy a DpMe-n kívül a PnO-ból is vezethessünk el eAP-okat. A Si-elektrod testen alkalmazott speciális kontaktus elhelyezés azt is lehetővé tette, hogy ezekből a magokból külön-külön, egy időben vezessünk el eAP-okat, mivel a mikromozgató segítségével hatékonyan tudtunk a szűrőcsatorna mentén eAP-okat gyűjteni az ARAS különböző magjaiból. Mivel a PPTg ventralis régiója patkányban a DpMe és PnO között helyezkedik el a ferde célzás síkjában, ez a kísérleti elrendezés felvetette a lehetőségét, hogy alkalmunk lesz arra, hogy szimultán vezessünk el idegsejt párokat a PPTg-ből és a kolinocéptív PnO-ból. Ezzel alkalmunk nyílhatna működés közben elvezetni a kolinerg PPTg sejteket a PnO sejtekkel, mely a kolinerg aktiváció mechanizmusának jobb megértését tenné lehetővé.

Az ARAS magjaiból összesen 453 idegsejt eAP-ját vezettük el, amelyekből a nagyon ritkán kisülők, vagy a csak rövid ideig regisztrálhatókat kizártuk (35 db). A fennmaradó 418 individuális eAP-ból további 20 db-ot zártunk ki az eAP alak szeparálás („sorting”) után, mivel alakjaik túl nagy varianciát mutattak a principális komponens analízis (Principal Component Analisis, PCA) alapján (ld.: metodika). Így összesen 398 db eAP-t tudtunk számításaink során felhasználni (ld.: **2. táblázat**). Ezek közül 287 db (~72%) rendelkezett nagy amplitúdójú, széles és aszimmetrikus eAP alakkal (ld.: **2. táblázat**). Ezeket a sejteket a hippocampusban és a kéregben jól kidolgozott terminológia alapján

2. Táblázat: Az elvezetett eAP-ok és típusaik megoszlása az ARAS magokban

	Széles (asszimmetrikus) ,spike'-alakok (principális jellegű)	Keskeny (szimmetrikus) ,spike'-alakok (lokális interneuron jellegű)
DpMe	77	26
PPTg	24	(4)
PnO	186 (124+62)	81
	287 (~72%)	111 (~28%)
453 kizárás → 418 „sorting” után → 398		

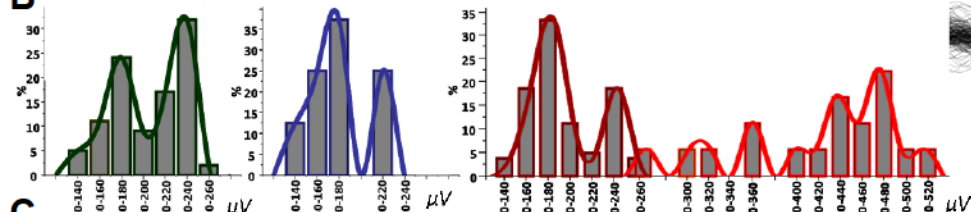
A piros darabszám a PnO órás sejtjeinek feltételezett eAP-ít jelzi.

principális jellegűnek neveztük el (Csicsvari és mtsai., 1998; Csicsvari és mtsai., 1999; Hirase és mtsai., 2001; Bartho és mtsai., 2004). Véleményünk szerint fontos hiánypótló eredmény az, hogy 111 (~28%) kis amplitúdójú, keskeny és szimmetrikus eAP alakkal rendelkező idegsejtet vezettünk el, amelyeket szintén az említett terminológia alapján lokális interneuron jellegűnek vezettünk be. A DpMe, a PPTg és PnO principális jellegű akciós potenciáljai közül a PnO-ból kitűnt egy eAP formája alapján jól elkülöníthető sejtpopuláció. Ezek, amelyek a PnO-ból elvezetett 186 principális jellegű eAP-okból 62 db-ot tettek ki (~33%), jól elkülönültek a többi principális jellegű 'spike' alaktól az eAP amplitúdójuk, pozitív (Positive Deflection, PD) és különösképpen a negatív (Negative Deflection, ND) deflektójuk alapján (átlag (+SD)) értékeik eloszlását a típusok között ld.: **5.4 ábra**. Mivel extracelluláris elektróddal nem lehetséges az elvezetett idegsejtjeinket megjelölni, jobb híján az ilyen 'spike' alakkal bíró idegsejteket tekintettük óriás idegsejteknek. Hasonlóképpen a kicsi, szimmetrikus 'spike' alakkal bíró idegsejtjeinket interneuronoknak azonosítottuk. A különböző 'spike' alakok számának struktúra szerinti megoszlását a **2. Táblázat** részletezi, míg az alvás-ébrenléti ciklus alatti maximális aktivitásukat (tüzelési ráta átlag ± SEM) a **5.5 ábra** mutatja. Azt a 26 db interneuron jellegű idegsejt aktivitást, amelyet a DpMe-ből (DpMei) vezettünk el, még nem rendeltük alvás-ébrenléti ciklusokhoz.

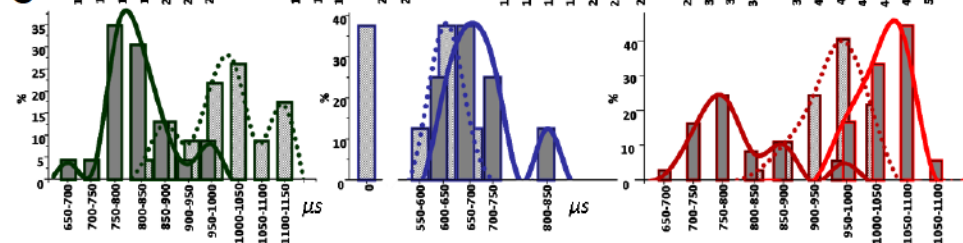
A

	n	Csúctól csúcsig (<i>ampl.</i>) (μV)	PD (ms)	ND (ms)
DpMe	77	198,2 (81,6)	843,3 (117,1)	1009,2 (299,9)
PPtg	24	162,4 (90,1)	712,3 (91,4)	642,5 (95,2)
PnO	124	195,4 (97,7)	818,2 (132,5)	947,8 (120,5)
PnO giant	62	419,8 (278,5)	1047,2 (196,8)	1574,6 (213,8)

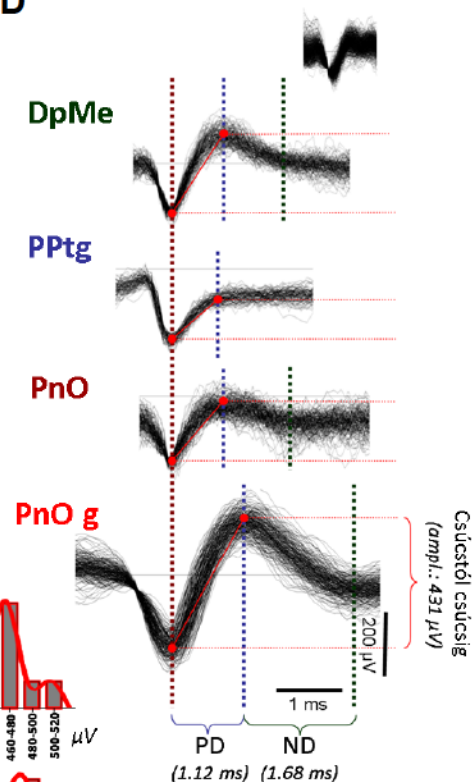
B



C

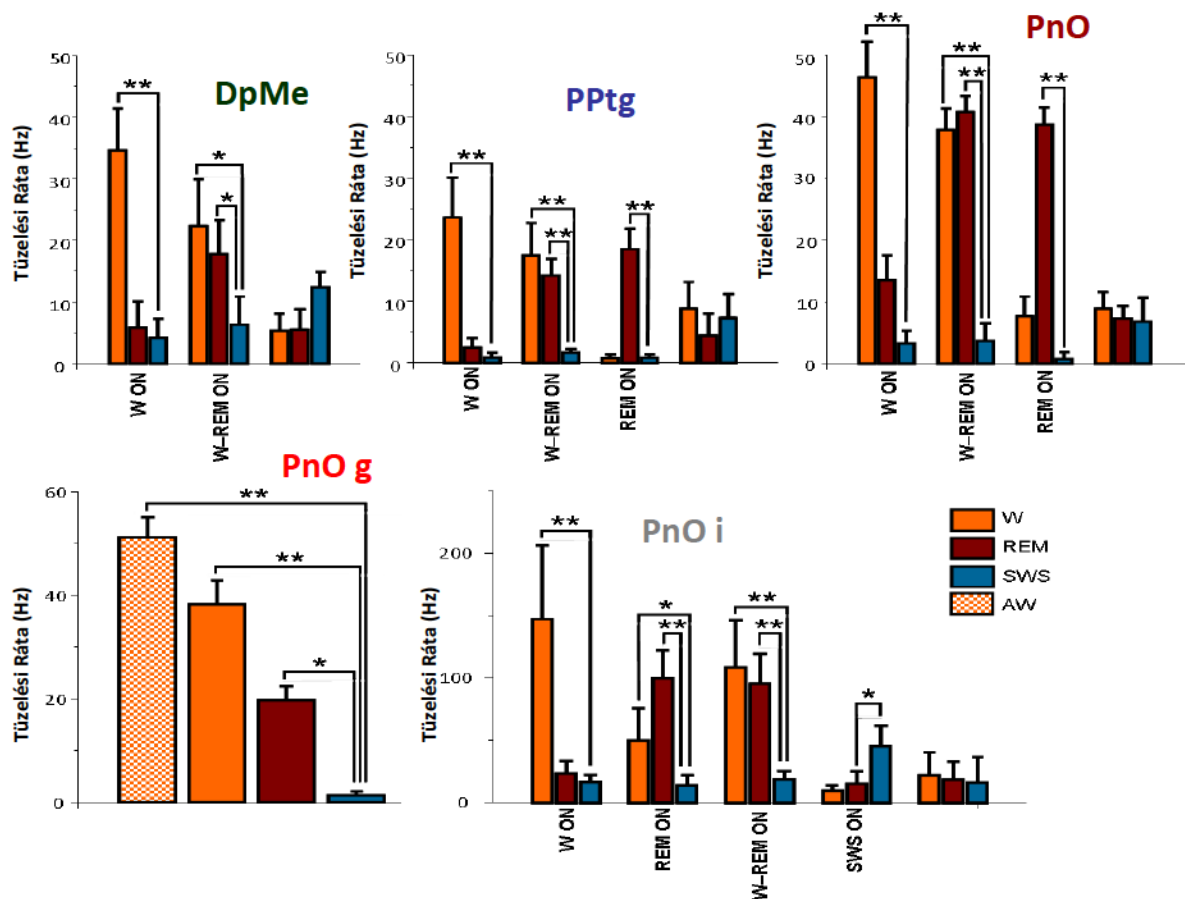


D



5.4 ábra AZ ARAS magjaiból elvezetett feltehetően principális-jellegű idegsejtek eAP-jainak forma szerinti kategorizálása. (A) A vizsgált eAP tulajdonságok (amplitúdó (μV), pozitív deflektió (PD) (ms) és negatív deflektió (ND) (ms)) átlagai ($\pm SD$) és megoszlásai a struktúrák között. (B) Az amplitúdók csúctól csúcsig számított (ld. : D vörös körben végződő vonalait) százalékos eloszlásai az elvezetett eAP-ra vonatkoztatva az adott struktúrán belül. Jól látható, hogy a PnO ND alapján óriás sejttől származónak (PnO g) minősített eAP-jai órási ampl. -val rendelkeztek ugyan de százalékos eloszlásuk elterülőknek volt mondható. (C) A PD-ók (sötétszürke oszlopok + Gauss-kernel illesztés (folytonos vonal)) és a ND-ók (világos szürke oszlopok + Gauss-kernel (szaggatott vonal)) százalékos eloszlása. Fontos megjegyezni, hogy a PPTg principális jellegű eAP-jaiból 8 db-ban (ld. : D is) ND nem volt megfigyelhető (ld. : D is). Az összehasonlított értékek között (ampl., PD és ND) a ND különült el leginkább a többi értéktől pozitív irányba, ezért a PnO g eAP-at ezen attribútum szerint szeparáltuk a PnO egyéb principális eAP alakoktól. (D) Reprezentatív példák a diszkriminált 'spike'-okról és jellemzőik kiszámításának módjáról. A jobb felső sarokban egy szimmetrikus eAP-alakú interneuronnak identifikált sejt 'spike' mérete és alakja látható összehasonlítás képp. Fontos megjegyeznünk, hogy a 'spike' sorter a diszkrimináló ablaka az adott eAP-hoz igazított ('K-means sorting'), de az amplitúdó és időskálák a csatornák között azonosak voltak ld.: metodika).

Összességében elmondható hogy a DpMe és PPTg-ből elvezetett principális jellegű eAP-val rendelkező idegsejtek a tüzelési rátájukat az irodalomban fellelhető eredményeknek megfelelően változtatták meg az alvásébrenléti ciklusokhoz rendelve (Steriade és Hobson, 1976; Hobson és Steriade, 1986; Datta és Siwek, 2002), azzal a különbséggel, hogy a mi kísérletünkben a maximális eAP rátájuk néhány esetben kissé magasabb volt (ld.: **5.5 ábra**). Fontos új eredmény, hogy a PnO gigantocelluláris sejtjei (PnO g), amelyeket összehasonlítottunk aktív (AW) és passzív ébrenlétben is, nem csak REM-alvás alatt, hanem ébrenlétben is megemelik eAP-juk rátáját, mégpedig a REM alatt elért ráta emelkedéssel összehasonlítva kétszeresére (ld.: **5.5 ábra**). Ez a PnO gigantocelluláris sejtjeinek deszinkronitást előidéző, azaz 'arousal' függő szerepét igazolja.



5.5 ábra A vizsgált javasolt sejtípusok aktivitása (ráta átlag \pm SEM) az alvás-ébrenléti ciklus alatt. Az adott sejt átlag tüzelési rátáját 3 különböző alvás ciklusból vett 2-2 perc W, REM és SWS szakasz átlagából számítottuk. Azokat az SEjteket, amelyek aktivitása nem változott meg szignifikánsan az alvás ciklusok folyamán (jelöletlen oszlop együttesek) állapotfüggetlennek tekintettük. (Folyt. : következő oldal)

A DpMe-ből elvezetett 77 sejtől 35 db (~45%) volt ébrenlét alatt fokozottan aktív (W ON), 14 db (~18%) mutatott fokozott aktivitást mind REM, mind éber állapotban (W-REM ON) és 28 db (~36%) állapotfüggetlennek volt tekinthető. A PPTg ventro-mediális részéből mért sejtek (24 db) közül 4 db (~17%) volt W ON, 13 db (~54%) W-REM ON, 5 db (~20%) REM ON és 2 db (~8%) volt állapotfüggetlen. A PnO egyéb principális jellegűnek besorolt sejtjeiből (124db) 19 (~15%) volt W ON, 46 (~37%) W-REM ON, 41 (~33%) REM-ON és 18 (~14%) állapotfüggetlen. A 81 db feltehetőleg lokális interneuron jellegű eAP-t, melyet a PnO-ból (PnO i) vezettünk el, rendkívül heterogén tüzelési sajátosságok jellemezték (ld.: **5.5 ábra**): közülük 17 (~20%) volt W ON, 10 (~12%) volt REM ON, 14 (~17%) volt WREM-ON sejt, 6 (~7%) volt NREM-on (SWS ON) és 34 (~42%) volt állapot független sejtől származó. Ez a fajta megoszlás ezen interneuronok bonyolult szabályozó, integrátor funkciójára utalhat.

A PPTg-ből elvezetett 'spike'-ok nem voltak könnyen kategorizálhatók az eAP formájuk alapján, és közülük csupán 4 db volt keskeny spike alakú, de általánosan elmondható, hogy a PPTg-ből kevés sejtet tudtunk elvezetni és a 28-ból 24 db inkább a principális jellegű kategóriába volt sorolható (ld.: **2. táblázat**). Sajnálatos módon szimultán csak néhány esetben sikerült a másik két magból mért eAP-okkal elvezetni a PPTg-ből (ld.: **3. táblázat**). Emiatt az a célunk, amelyik fel szeretne volna tárni a kolinerg hatásokat a PnO-ban nem teljesült, ugyanis monoszinaptikus kapcsolatot egyáltalán nem sikerült kimutatni a PPTg és a PnO sejtjei közt (ld.: **3. táblázat**). Ennek oka több mint valószínű, hogy statisztikai, mivel összességében is túl kevés PPTg sejtet vezettünk el és ez még inkább igaz volt a másik struktúrákkal való szimultán regisztrációk összehasonlításában (ld.: **2. és 3. táblázat**).

5.5 ábra folyt.: A eAP tüzelési rátáit mindig a legalacsonyabb rátával jellemezhető állapotához hasonlítottuk, mely egy csoport kivételével (SWS-ON PnO i: itt a REM volt a referencia) a SWS volt (Bonferroni t-teszt *p < 0,05, **p < 0,01; ± SEM).

A DpMe-ből és a PnO-ból elvezetett principális jellegű és a PnO óriás sejtnak tulajdonított eAP-kat (PnO g) azonban számos esetben sikerült regisztrálnunk az alvás-ébrenlét ciklus folyamán, melyekből az így történő parallel elvezetések 764-szer tudtuk egymással keresztkorreláltatni (784 db keresztkorreláció, Cross Correlograms, CCG). E három szimultán elvezetett idegsejt populáció eAP kisülési aktivitását külön-külön hozzá tudtuk rendelni az alvás-ébrenlét ciklus folyamán mért SWS/W átmenethez (Bonferroni t-teszt * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; \pm SEM) (ld.: **3. táblázat** és **5.6 ábra**).

3. Táblázat: A szimultán elvezetett sejtek és keresztkorrelációik által talált monoszinaptikus kapcsolatok megoszlása

		Paralell elvezetett sejt-párok (db keresztkorreláció)					
		DpMe p.	PpTg p.	PnO p.	PnO g.	DpMe l.i.	PnO l.i.
Monoszinaptikus kapcsolatok (piros: excitatórikus, kék: inhibitoros, lilá: reciprok)	DpMe p.	126	36	102	30	34	2
	PpTg p.	--	8	2	6	2	0
	PnO p.	--	--	322	98	10	142
	PnO g.	--	--	1	86	4	62
	DpMe l.i.	1	--	--	--	18	4
	PnO l.i.	--	--	4	10	--	176

$\Sigma = 378$ sejt-pár

$\Sigma = 20$ monoszinaptikus kapcsolat

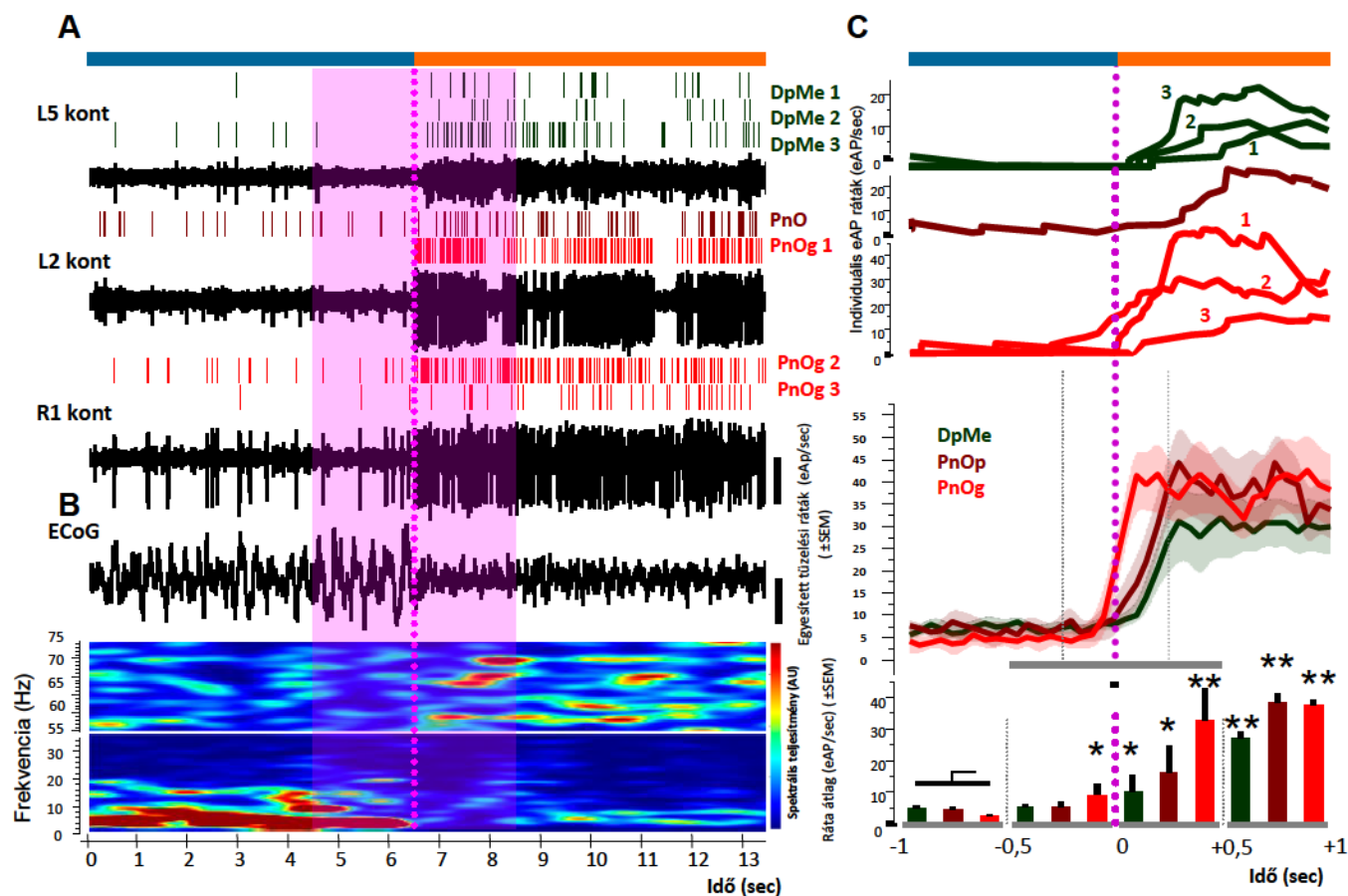
*: a PnO g/PnO g kapcsolatok metodikai okok miatt (ld.: metodika) feltárhatatlanok maradtak.

** : ez a reciprok jellegű kapcsolat a 4.8 ábrán külön tárgyalásra kerül

Összességében elmondható, hogy mind a három sejt-populáció megemelte tüzelési rátáját az ébrenlétbe való átmenetkor. Kísérleteinkben új adatnak számít az, hogy a PnO óriás sejtjei populációs szinten már kissé az átmenet előtt

megemelik tüzelési rátájukat (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; \pm SEM) (ld.: **5.6 ábra**). Ez az adat megerősíti, hogy nem csak a DpMe és a rostralis PnC, hanem a PnO is tartalmaz deszinkron pozitív ('arousal' függő) idegsejteket, melyek közül az óriás sejtek kitüntetett szereppel bírnak, ugyanis az, hogy már az átmenet előtt megemelkedett tüzelési rátával rendelkeznek, aláhúzza az 'arousal' hatás inicializációjában betöltött alapvető szerepüket (ld.: **5.6 ábra**). Emlékeztetőül ez az adat azért hiánypótló jellegű, mert először írja le, hogy a PnO principális és óriás sejtjei is az EEG aktivációjakor emelkedő tüzelési rátát mutatnak, melyeket ezelőtt az eAP-k szintjén csak a DpMe-ban és a PnC-ban írtak le (McCarley és Hobson, 1971; Vertes, 1977; Steriade és mtsai., 1982; Hobson és Steriade, 1986). Ezen kívül ismereteink szerint a munka először regisztrált - a kérgi régiókban mérhetőkhöz hasonló - kis amplitúdójú és keskeny 'spike'-okkal rendelkező, feltehetően interneuronokat. Ezek aktivitása nagy heterogenitást mutatott, ugyanakkor a szimultán elvezetésekben néhányuk alternáló aktivitást mutatott az óriás sejtek tüzelésével szemben. Ebből a néhány esetből (6db SWS ON PnOi.: ld.: **5.5 ábra**) úgy tűnt, hogy egyes, feltehetőleg lokális interneuronok, hatékonyan képesek monoszinaptikus kapcsolatban gátolni az óriás sejteket.

Annak érdekében, hogy ezeket a feltételezett monoszinaptikus kapcsolatokat kimutassuk az interneuronok és az óriás sejtek között, a szimultán elvezetett AP-okat keresztkorreláltuk (Csicsvari és mtsai., 1998). Az 1594 db keresztkorreláció, melyet a 378 sejt-pár adott 17 monoszinaptikus kapcsolatot tárt föl a CCG analízisben (ld.: **3. táblázat**). Fontos megjegyezni hogy mivel az óriás sejtek spike alakja (PnOg) extrém szélesnek mutatkozott (ld.: **5.4 ábra**), ezen sejtek egymásra kifejtett, rövid távú, monoszinaptikus hatásait a keresztkorrelációs módszer nem tudta kimutatni (ld.: **3. táblázat**), ugyanis ez a széles spike alak átfedett a keresztkorrelogrammok excitációra szenzitív szakaszával (ld.: metodika), így ezeknek a kapcsolatoknak a monoszinaptikus feltérképezéséhez a jövőben speciális matematikai dekomponálási algoritmus használatára lesz szükség. A feltérképezett monoszinaptikus kapcsolatok minőségét (excitáció, inhibíció) a **3. táblázat** részletezi.

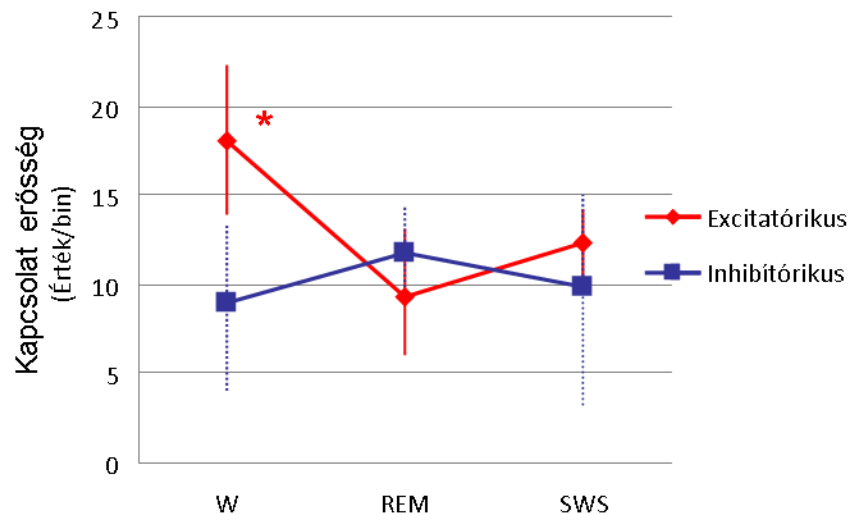


Jól látható módon a PnO- ban elhelyezkedő neuronok között sikerült több sejtpárt elvezetni. Ez a jelenség részben statisztikai okokból eredeztethető, ugyanis az egyetlen szűrt csatornával rendelkező elektródunk hegyét általában a PPTg ventrális állományába implantáltuk és innen kezdtük a krónikus elvezetésekben az elektród mozdítását caudo-ventralis irányba (ld.: metodika). Belátható, hogy az egyetlen szűrt csatornával rendelkező elektród jóval nagyobb eséllyel vezetett el idegsejteket a hegyén elhelyezett kontaktusokkal, mely kísérleteinkben főként a PnO állományát keresztezte, tehát innen regisztráltunk nagyobb számú eAP aktivitást. Ez az effektus több tényező miatt is fennáll: a szűrt csatorna öregedésével a gliásodás sokkal inkább kiterjed a hegytől távolabbi elektród kontaktusok körül, mely előrehaladtával egyre kevesebb sikeres neuron – elektród kontaktus fordul elő és egyébként is mindig az elektród hegye találkozik a friss szövetrel a mozgások során, mely önmagában is hatványozza az innen elvezethető sejtek számát (ld.: metodika). Mivel a monoszinaptikus kapcsolatok az egymáshoz közel lévő sejtekben nagyobb valószínűséggel fordultak elő, hasonlóan más agyterületekből Si-elektróddal mért adatokhoz (Bartho és mtsai., 2004; Fujisawa és mtsai., 2008; Vizuete és mtsai., 2012), ez a statisztikai ok vezethetett ahhoz, hogy innen (PnO-on belül) sikerült több monoszinaptikus kapcsolatot feltérképeznünk (ld.: **3. táblázat**).

5.4 Az óriás sejtek és az interneuronok közti szinaptikus kapcsolat dinamikusan változó az alvás-ébrenléti ciklus alatt

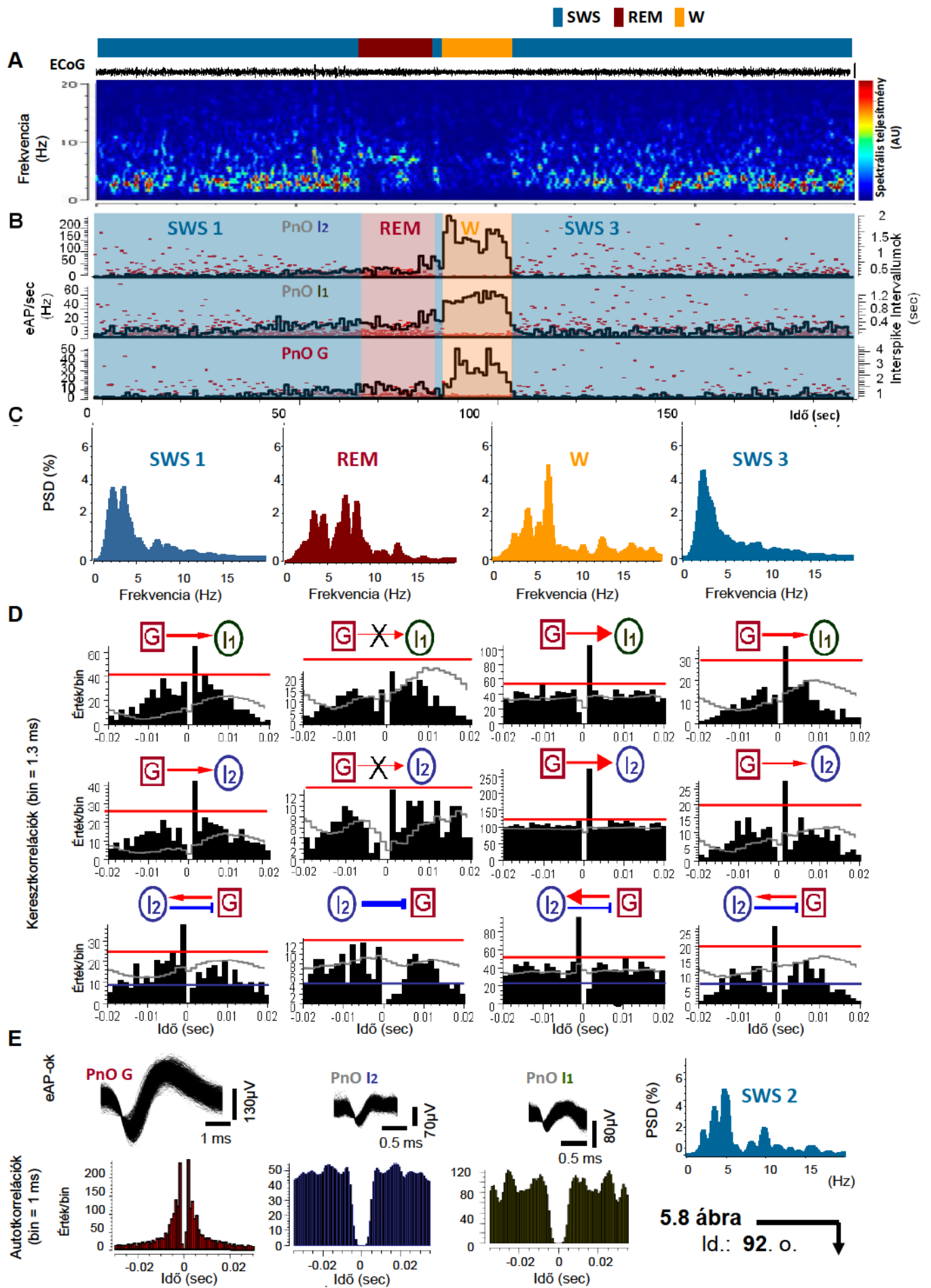
Sajnos, ahogy már említettük, a ventralis PPTg-ből nem sikerült elegendő egysejt aktivitást regisztrálnunk ahhoz, hogy az itt elhelyezkedő sejteket a többi struktúra (DpMe, PnO) egyéb sejtjeivel összehasonlíthassuk. A PnO lokális hálózatában azonban sikerült megkülönböztetnünk mind excitátoros (9), mind pedig inhibitoros (5) monoszinaptikus kapcsolatokat, melyek közül 10 volt óriás sejt – interneuron interakció ((6 excitátoros (E), és 4 inhibitorikus (I), melyek közül egy volt reciprok (R) kapcsolat) ld.: **3. táblázat** és **5.8 ábra**)). Érdekelt minket, hogy ezen monoszinaptikus kapcsolatok erőssége, mely a 'spike' átvitel

hatékonyaságát tükrözi (ld.: metodika), hogyan változik meg az alvás-ébrenléti ciklus során az óriás sejtek és az interneuronok között. Érdekes módon a köztük lévő kapcsoltság ereje (Connection Strenghth, CS) a néhány elvezethető esetet tekintve egybevágóan változott meg, főképp az excitatórikus (E) kapcsolatokban (ld.: **5.7 ábra**).



5. 7 ábra A rövid távú 'spike' átviteli hatékonyság (mono szinaptikus kapcsolat erősség) megváltozása az alvás-ébrenléti ciklus alatt. A kapcsolat erősségét a CCG csúcsának (E), vagy elmaradásának (I) és a randomizált 'spike' keverés adta szignifikancia küszöb közti különbség adja meg (ld.: **4.8 ábra** és metodika). Látható, hogy a REM fázisban a gátló (I) kapcsolat ereje magas, míg a serkentő (E) alacsony. W alatt a PnO óriás sejtei hatékonyan hajtják meg a kapcsolt interneuronokat (lineáris trend $p^* < 0,05$ (ANOVA)). A gátló kapcsolatok erősségéből a kicsi esetszám miatt nem készült statisztika ($N(E)=6$ és $N(I)=4$).

Az E kapcsolatok erőssége az alvás-ciklus alatt jellemzően W alatt volt a legmagasabb, míg REM alatt volt a minimumán. Az I kapcsolatok ennek a trendnek az ellenkezőjét mutatták. Ez az alternáló viszony a ciklus alatt utalhat arra, hogy a PnO interneuronjai lokális gátlással hatékonyan elnyomják az óriás sejtek aktivitását REM alatt és fordítva, az óriás projekciós idegsejtek (valószínűsíthetően lokális kollaterálist képezve) meghajtják a közeli interneuronokat W és SWS alatt. A kapcsolatuk erősségének dramatikus megváltozása REM alatt (melyet okozhat egy struktúrán kívülről érkező



hipotetizálható hatás is), aláhúzza a kapcsolat fontos REM alvást szabályozó szerepét. Fontos hangsúlyoznunk azonban, hogy a feltárt monoszinaptikus kapcsolatok száma egyelőre nagyon kevés és emiatt nem vonható le belőlük általánosítható következtetés.

Egy szerencsés esetben sikerült elvezetnünk a PnO-ból egy monoszinaptikusan kapcsolt sejt triplettet (ld.: **5.8 ábra E**). Ezt a három sejtet és monoszinaptikus kapcsolataik erősségét, mely állapotfüggő lehet, végigkísértük egy alvás-ébrenléti mikrocikluson (ld.: **5.8 ábra**). A sejt triplett-ben egy óriás sejt és két interneuron szerepelt (PnOG, PnO I1 és I2). Az óriás sejt excitátorosan (E) innerválta az egyik interneuront, míg a másik neuronnal reciprok kapcsolatban állt (ld.: **5.8 ábra D**).

Mindhárom monoszinaptikus sejt tüzelési rátája az W alatt volt a legmagasabb és a SWS alatt volt a minimumon (ld.: **5.8 ábra B**).

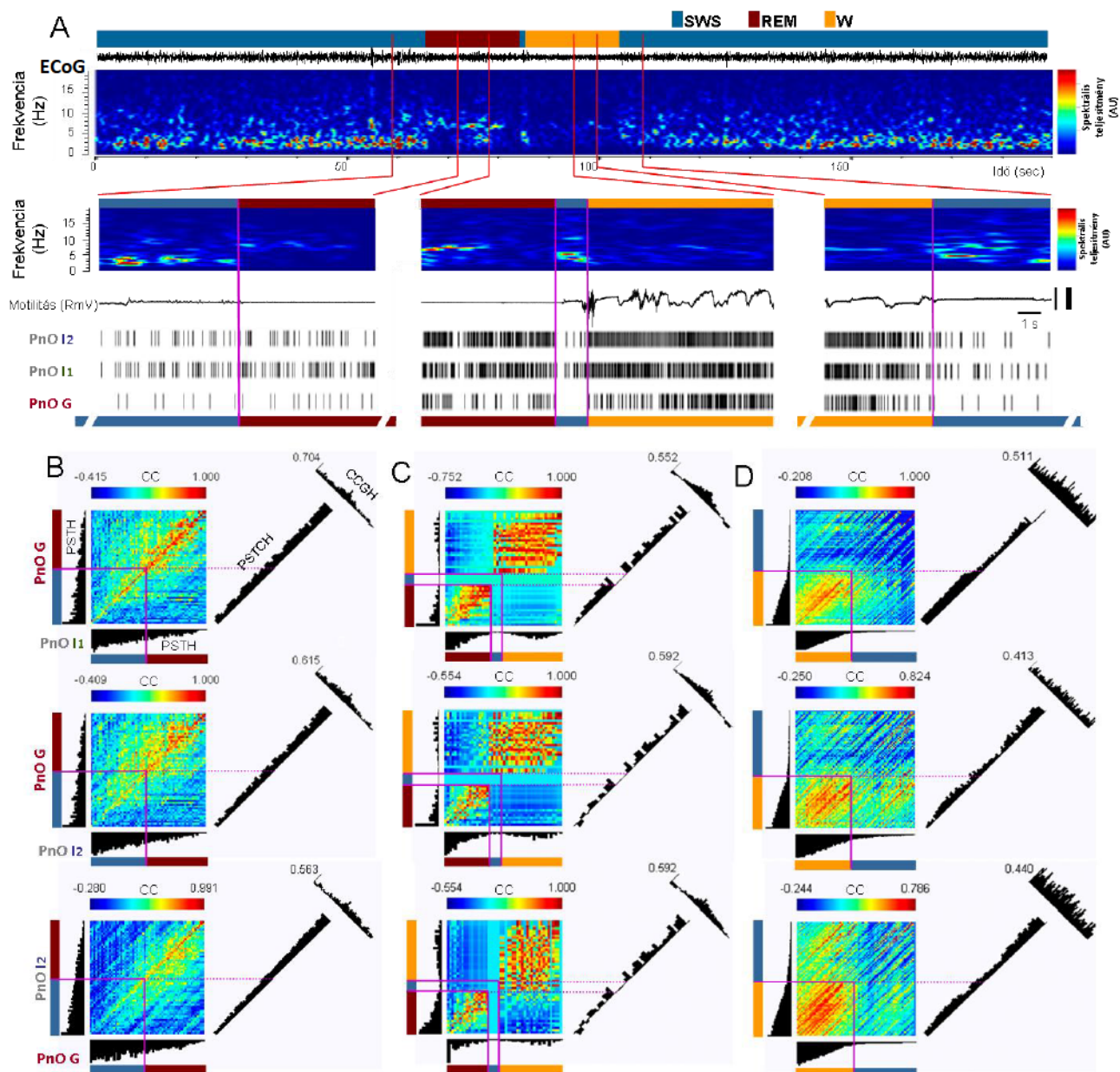


5.8 ábra Monoszinaptikusan kapcsolt sejt triplett kapcsolatainak állapotfüggő (SWS, REM és W) változása egy alvás mikrociklusban. (A) Az alvás mikrociklus ECoG-ja és spektrogramja. Az akcelerométer görbét a nagy felbontás miatt nem mutatjuk, de nagyobb felbontásban (ld.: **4.9 ábra**, kalib.: 300mV). (B) A három kapcsolt sejt (PnO óriás sejt: PnO G és interneuronok: PnOI1 és 2) rátaváltozásainak (ld.: fekete vonalak, értékek balra) és 'interspike' intervallumainak (ld.: piros pontok, értékek jobbra). (C) A különböző fázisokból kalkulált teljesítmény spektrumok (a REM és a W közé ékelődő rövid lassú hullámú alvás szakasz orsós jellegű volt (PSD-jét ld.: E). (D) A kapcsolatok CCG-jai ciklusként kalkulálva. Jól látható, hogy a PnO G referencia helyzetben hatékonyan hajtja meg a két interneuront (PnOI1 és 2) SWS és W alatt. A CCG-ok szenzitív periódusából (+1.3 - + 5.2 ms) REM alatt eltűnik az E kapcsolatot jelző csúcs, mely a kapcsolat átmeneti megszűnését jelenti. Az 'spike' helyettesítő eljárásból számolt E monoszinaptikus küszöböt (+3 SD) piros vonal jelzi. A randomizálás középtértékét szürke vonal jelzi (ld.: metodika). Mivel a PnO G és PnO I2 sejt egyetlen kontaktusról volt elvezetve esetünkben vak periódust alkalmaztunk a szeparálásuk során (ez a CCG-ok centrális bin-jének hiányában érhető tetten ld.: metodika). Kiténik, hogy a szinaptikus átvitel az W alatt maximális. A PnO G és PnO I2 reciprok kapcsolatban áll. Ezt a PnO I2 referencia helyzetéből számolt CCG-ok jól látszik (ld.: 'spike' szupresszió a csúcs után). A I kapcsolatok számított küszöbét lila vonal jelzi. REM alatt a reciprok kapcsolatból jól megfigyelhetően csak a gátlás marad meg a PnO G felé, de megerősödött formában. (E) Az elvezetett sejtek eAP formái és ezek autokorrelációi. A PnO G eAP alakjában megfigyelhető kisebb amplitudójú 'spike' alakokat a W alatt megnövekedett frekvencia hatására létrejött kisebb 'spike'-ok adják (ún. 'decay' mechanizmus). A sejtek kisüléseinek nagyobb felbontását a ciklus alatt ld.: **4.9 ábra**)

Nagyon fontos itt megjegyezni, hogy a monoszinaptikus spike átviteli hatékonyság összefüggésben lehet az adott preszinaptikus sejt aktuális eAP rátájával. Számos esetben leírták a vizuális rendszerben, hogy ha a preszinaptikus eAP-ok rövid interspike-intervallummal (ISI) követik egymást, akkor hatékonyabban készítetik kisülésre a posztzinaptikus sejtet (Usrey és mtsai., 1998; Kara és Reid, 2003). Azonban számos példa van arra, hogy a szinaptikus kapcsolatok erősségének megváltozása nem áll direkt összefüggésben a tüzelési rátával (Riehle és mtsai., 1997; Vizuete és mtsai., 2012). A mi esetünkben ez utóbbi valószínűsíthető, mivel a REM alatt mindhárom sejt emelte tüzelési rátáját (ld.: **5.8 ábra B**) ellenben az E kapcsolatok kritikus szint alá csökkentek, míg az I kapcsolat erőssége nőtt (**5.8 ábra D**).

Az, hogy a PnO belső hálózatában a monoszinaptikusan kapcsolt idegsejtek rövid távú E szinaptikus átviteli hatékonysága a REM alvás alatt volt a leggyengébb és ez fordított volt az I kapcsolatban, egy másik struktúra PnO-ba érkező szinaptikus inváziójára utalhat. Ez a hatás származhat a PPTg kolinerg sejtjeitől, melyek valószínűsíthetően a PnO lokális interneuronjain fejtik ki hatásukat (Xi és mtsai., 1999b; Watson és mtsai., 2011), azonban kísérleteinkben sajnálatos módon ez csak akkor lett volna bizonyítható ha a PnO lokális interneuronjai és a PPTg sejtjei között monoszinaptikusan tudunk volnáz SEjtpárokat elvezetni. Az irodalmi adatok alapján azonban ez a jelenség (CS csökkenés) valószínűsíthetőleg a kolinerg hatások számlájára írhatók.

A kiemelt monoszinaptikusan kapcsolt sejt triplett-en ún. kísérő peristimulus idő mátrix hisztogram (Joint Peristimulus-Time Histogramm, JPSTH) analízist is elvégeztünk, amely valójában egy dinamikus keresztkorrelációs módszer (ld.: metodika) (Aertsen és mtsai., 1989; Nadasdy és mtsai., 1999; Sirota és mtsai., 2003). Az analízis azt mutatja meg, hogy időben hogyan változik meg két sejt effektív kapcsoltsága (Effective Connectivity, EC) (Aertsen és Gerstein, 1985; Gerstein és Aertsen, 1985). Ezen a sejt tripleten, melyben a három sejt statikus keresztkorrelációkkal bizonyíthatóan monoszinaptikus volt, azért végeztük el a JPSTH analízist, mert feltételeztük, hogy jelen van a PnO-ban a bevezetőben



5.9 ábra A sejt párok kapcsolatának effektív konnektivitása (EC) dinamikusan változó az alvás-ébrenléti ciklus alatt. (A) Ugyanannak az alvás mikrociklusnak a spektrogramjai nagyobb nagyításban (ld.: 4.8 ábra). Alatta az akcelerométer által monitorozott motilitás (Kalib.: 0,5 Relatív mV, RmV; ld.: metodika) és a sejtek egyedi eAP-jainak kisülései láthatók. (B) A három kapcsolat SWS/REM átmenet alatti JPSTH analízise. A színekódolt négyzetek a JPSTH-ok korrelációs mátrixa, melyet az adott pixel-re (bin= 0.08 sec) vonatkoztatott korrelációs koefficiens (Correlation Coefficient, CC) értéke ad meg sárga, narancssárga és piros színekkel. Az intenzív színek az erősebb EC-t mutatják a sejtek között. A matrix a referencia sejt (mindig függőleges helyzetben) és a poszt-sinaptikus sejt (mindig vízszintesen) feketével ábrázolt peristimulus idő hisztogramjaiból (Peristimulus-Time Histogram, PSTH) korrelált értékekből származtatott (ld.: metodika). A JPSTH mátrixoktól jobbra a közvetlenül a diagonális (idő) tengely körüli kisebb időtartamból (itt -0.005,+0.005 sec) számított peristimulus koincidencia hisztogram (Peristimulus Coincidence Histogram, PSTCH) látható. (folytatás: ld. következő oldal)

ismertetett jelenség, miszerint a SWS/REM átmenet előtt az óriás sejtek nem élesen, hanem gradált módon változtatják meg aktivitásukat (Ito és mtsai., 2002). Az irodalmi bevezetőben tárgyaltak alapján, feltételeztük, hogy az óriás sejtek a REM megjelente előtt, még a SWS folyamán, egy rendkívül érdekes, inkubációs szakaszban integrálják szinaptikus bemeneteiket és ezt a hatást esetleg a körülöttük lévő interneuronokkal együtt tetten érhetjük az eAP-k szintjén is.

A JPSTH mátrixok jól mutatják azt, hogy az effektív konnektivitás (EC) már az SWS alatt megemelkedik, mind a két jellegű kapcsolatban, még mielőtt az állat belépne a REM alvásba (ld.: **5.9 ábra B, C és D**). Itt hívjuk fel a figyelmet arra, hogy természetesen, mivel egy alvási mikrociklust analizáltunk ilyen módon végig, a REM és az W közé egy rövid lassú hullámú, rövid orsó-jellegű aktivitással rendelkező SWS szakasz ékelődött be (ld.: **5.8 ábra A, B és E, 5.9 ábra A és C**). Jól látható, hogy ebben a szakaszban az EC szinte átmenet nélkül szűnik meg a vizsgált sejt hármában (ld.: **5.9 ábra C**). Ez a jelenség valójában generális a SWS alatt (EC minimum) (ld.: **5.9 ábra B és D**). Emlékeztetnénk a metodikai részben laírtakra, hogy a CCG analízisből számolt CS (kapcsoltság erősség) a tényleges szinaptikus átvitel hatékonyságának erősségét vizsgálja rövid időtartományban, míg az EC egy vonatkoztatott matematikai módszerrel időben vizsgálja az adott sejtek eAP-jainak propagálódását (Aertsen és mtsai., 1989; Ito és Tsuji, 2000).

5.9 ábra folyt.: A sarokban a PSTCH paradiagonális bin-jeinek átlagolt értékéből számított keresztkorrelációs hisztogram (Cross Correlogram Hystogram, CCGH) látható. Hangsúlyozandó, hogy a PSTCH és a CCGH átlagolt értékekből komponált. Emiatt a CCGH- ból az átmenet hatásai kiátlagolódnak, hisz az analízis átnyúlik a vizsgált átmeneten (összehasonlításban ld.: **4.8 ábra D**). (A JPSTH mátrixának normalizációs számítását ld.: metodika és (Aertsen és mts., 1989)). A vizsgált átmenet 28 sec hosszú volt (ld.: **A** megszakított időszáv vonal). (C) REM/SWS/W átmenet JPSTH elemzése (időtartam 17,5 sec ld.: **A**, bin= 0,002 sec). Jól láthatóan a REM szakaszban a EC 0 (a PnO G nem sül ki). (D) W/SWS átmenet JPSTH mátrixai (30sec időtartam, bin= 0,005). Fontos kiemelni, hogy EC intenzitása csak egy adott oszlopon belül összehasonlítható (értsd **B, C és D** oszlopai), ugyanis a bin kiválasztás a jól ábrázolhatóság érdekében az adott átmenet szakaszhoz igazított. Az ábra értelmezését ld. a szövegben.

Ezért az, hogy a statikus CCG analízis alatt az SWS folyamán mért E CS magasabb, míg a dinamikus JPSTH elemzésben az EC alacsony és fordítva (ld.: **5.7 ábra**, **5.8 ábra D** és **5.9 ábra A és B**) a REM alatt az E CS minimumán van az EC viszont magas, csak látszólagos ellentmondás hiszen a két módszer időben és minőségileg is más jellegű kapcsolatot vizsgál (Aertsen és mtsai., 1989; Ventura és mtsai., 2005b, a; Amarasingham és mtsai., 2012). Ez a különbség a két kapcsoltsági minőség között (CS és EC) a REM és az SWS alatt, valamint az a jelenség, hogy a sejtek eAP-jainak ISI-ai már a SWS/REM átmenet előtt masszívan csökkentek amit a rátájukban növekedés csak mérsékelten követett a rátájuk emelkedése (ld.: **5.8 ábra B**), csak azzal magyarázható, hogy a sejtek egy új jellemzőkkel bíró működési módba válnak REM alatt és ennek jelei már az SWS alatt elkezdődnek. A jelenség felveti, hogy a REM indukció a PnO-ban nem csak az eAP-ok rátáján keresztül valósul meg, hanem az eAP-ok fázikus és/vagy 'burst'-ös üzemmódba toborzódása által is megvalósulhat. Emiatt a jövőben érdemes lesz ennek az átmenetnek (SWS/REM) a fázis és 'burst' analízisével, valamint ISI aszimmetria indexének számításával részletesen kivizsgálni a természetét.

5.5 A PnO lokális paralízise komatikus állapothoz vezet

Mivel az SE kései fázisához (Treiman-féle 4. fázis) tudatvesztés is társult a lassú hullámú periodikus epileptiform kisülések mellé. Ebben az állapotban az ARAS magjai közül a PnO nagy sejtes állománya szenvedte el a legnagyobb hisztopatológiailag kimutatható sérülést (ld.: **1.22**, **5.1**, **5.2** és **5.3 ábra**). Mivel szabadon mozgó állatokban a fizioológias működéshez társítva a PnO-ban lévő, valószínűsíthetően óriás sejtek *arousal* függőek voltak (ld.: **5.6 ábra**), érdekelt minket az, hogy milyen hatásokkal bír egy szabadon mozgó állat viselkedésére és fizioológiai paramétereire, ha a PnO-t lokálisan paralizáljuk. Ennek érdekében mikrodialízissel (ld.:metodika) tetrodotoxint (TTX, 1 μ M) adtunk be az állatok PnO-jába. Azért esett a választásunk a TTX-re, mivel ennek diffúziója a mikrodialitikus membrántól jól validált az irodalomban (Boehnke és Rasmusson,

2001; van Duuren és mtsai., 2007). A mikrodialitikus szonda ('probe') mandrinnal ellátott kanüljét a kisagyon keresztül vezettük be a PnO bilaterálisan elhelyezkedő magjai közé, ahol a mediális raphe (MnR) állománya volt. Azért a két PnO közé vezettük be, mert az irodalom szerint az 1 μ M TTX ~500 μ m sugárban terjed szét a szövetben (van Duuren és mtsai., 2007), emiatt számításaink után úgy gondoltuk, hogy ha a két PnO közé helyezzük el a mandrin kihúzása után a mikrodialitikus 'probe' membránjának aktív felszínét, akkor a TTX a PnO állományát bilaterálisan bénítani tudja.

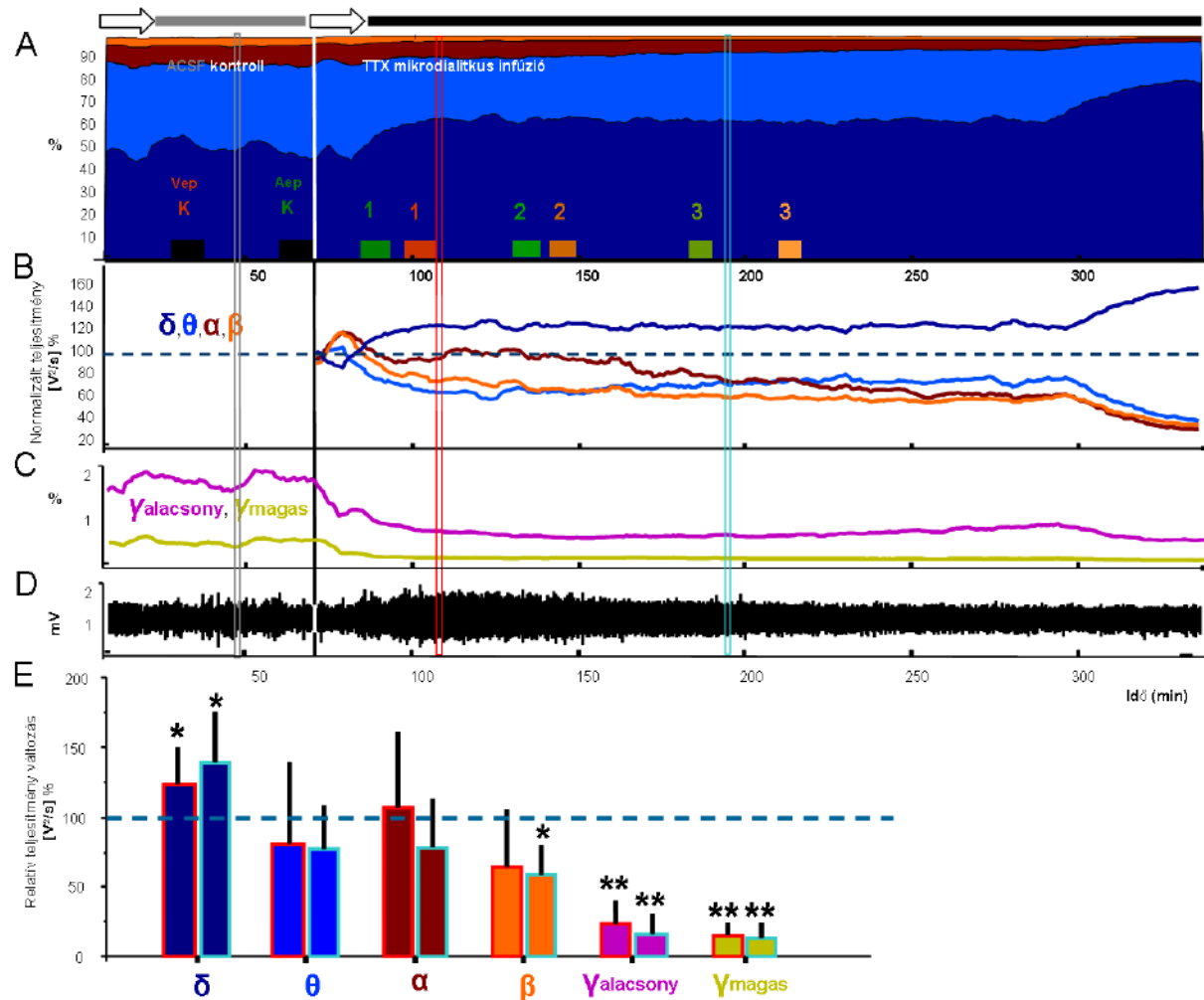
Mivel a tartós vegetatív állapotban (persistent vegetative state, PVS) vagy minimális tudati állapotban (minimal consciousness state, MCS) állapotban lévő betegekben a szenzoros hatásokra adott kiváltott válaszok megváltoztak vagy tompultak (Perrin és mtsai., 2006; Boly és mtsai., 2011; Faugeras és mtsai., 2011), állatainkat a dialízis alatt auditoros (Auditory Evoked Potential, AEP) és vizuális (Visual Evoked Potential, VEP) kiváltott potenciálokkal is monitoroztuk (ld.: metodika). Nem csak a trauma, vagy metabolikus sokk esetében létrejövő tudatvesztéshez (kóma, PVS), vagy tudat csökkenéshez társuló (MCS, Locked in szindróma) társul EP-ok szenzitív és speciális megváltozását (Vanhaudenhuyse és mtsai., 2008; Schnakers és mtsai., 2009), hanem az általános anesztézia szintjeit is rendkívül megbízhatóan tükrözi azáltal, hogy a különböző szintű (szedációtól a mély anesztéziáig) altatott állapotokhoz rendelhető agykérgi elektromos reaktivitást igen hatékonyan mutatják meg (Lyon és mtsai., 2005; Schneider és mtsai., 2005). Ez olyannyira általános és standardizált, hogy rutin szinten használják őket az anesztézia monitorozására a gyakorlatban (Ypparila és mtsai., 2004; Bruhn és mtsai., 2005). Az agykéregről elvezetett szenzoros kiváltott válaszok generalizált jelek, ezért úgy gondoltuk, mivel az agytörzs részt vesz az elektromos aktivitás szintjén jelentkező hatások generalizációjában, hogy a kiváltott válaszokkal nyomon követhetjük a tudatvesztéssel járó állapot kifejlődését a TTX dialízis alatt.

A bevezetőben ismertettük, hogy a PnC óriás sejtjei közvetítik a gerincvelő felé a reflexesen megjelenő megremeztetési reakciót (Koch és mtsai., 1992; Lingenhohl és Friauf, 1994; Nodal és Lopez, 2003), amelyet azonban

hatékonyan befolyásol egy bonyolult, agykéreghez köthető szabályozó rendszer (Leumann és mtsai., 2001; Weber és mtsai., 2002). Azzal a 3 dimenziós (3D) akcelerométerrel, mellyel szabadon mozgó állataink motilitását követtük nyomon, a magas frekvenciás fehér zajra adott megrezzenési reakciót is jól tudtuk monitorozni (ld.: **5.13 ábra**).

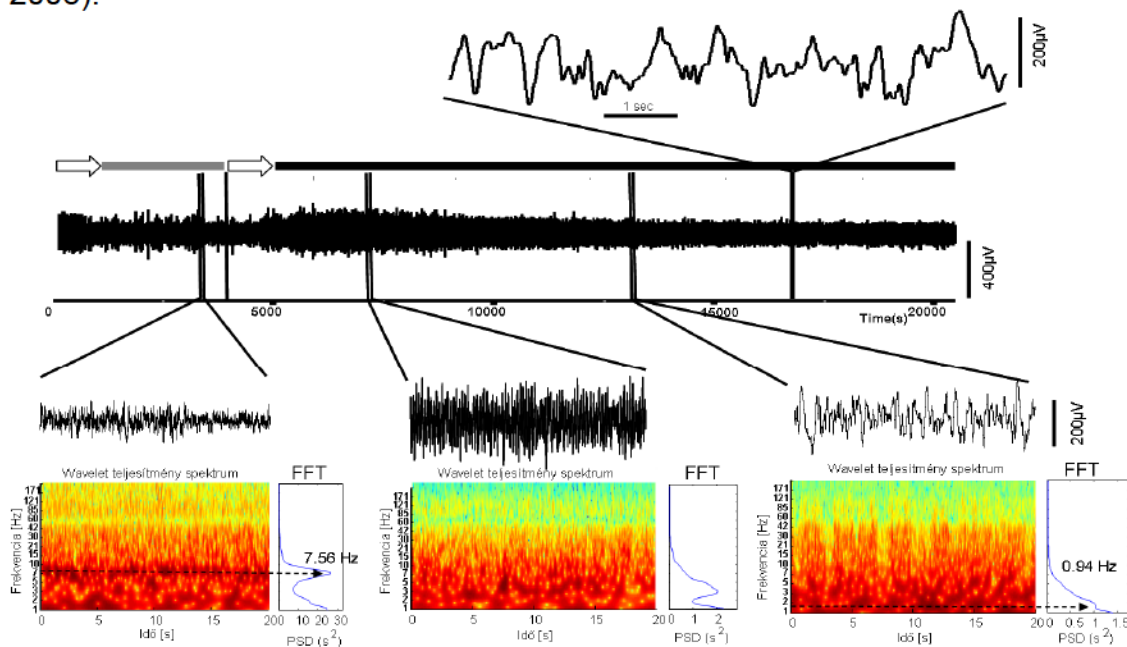
A TTX dializálásának hatására az állatok viselkedésében azonnal jelentős változás állt be, melyet hosszan monitoroztunk a dialízis kezdetétől (ld.: **5.10, 5.11, 5.12 és 5.13 ábra**). Az állatok egy átmeneti tremoros állapot után (5-10 perc, ld.: **5.10 ábra A, 5.13 ábra E és F**) egy jellegzetesen kómára jellemző, delta dominált állapotba jutottak. Ez az első szakasz (5-10 perc) rendkívül érdekes volt, ugyanis az EEG alacsonyabb tartományai (delta, theta, alfa és béta) teljesítménye kissé emelkedett alatta, miközben az alacsony és magas gamma tartomány a dialízis kezdete után azonnal csökkenésnek indult (ld.: **5.10 ábra**). Ez a jelenség kompenzatorikus mechanizmusokat feltételez, mellyel az agy válaszol a TTX paralizáló hatására és ez a hatás további magyarázatra szorul. Tíz perc dialízis után ugyanakkor (feltételezhetően ez az idő, amikor a mesterséges gerincvelő folyadékot (arteficial cerebrospinal fluid, ACSF) tartalmazó kontroll 'probe' után behelyezett TTX-et tartalmazó mikrodialízis 'probe' membránja körül kémiai egyensúly állt be), az EEG frekvencia tartományaira egyre inkább a delta dominancia volt jellemző, mely az állat tudatának elvesztésével járt együtt (ld.: **5.10 ábra A, B, E és 5.13 ábra**). A PnO-ba történt TTX dialízis hatására a gamma tartomány gyakorlatilag teljesen eltűnt az EEG spektrumból (ld.: **5.10 ábra C, E és 5.11 ábra**). Az állatok magatartási és EEG képe mellé mind a vizuális, mind az auditoros kiváltó ingerre nézve eltűnt a kérgi reaktivitás (ld.: **5.12 ábra**). Eleinte úgy gondoltuk, hogy az AEP-ok szenzitívebben monitorozzák az agykérgi arousal meglétét, ugyanis ez jól bizonyított (Winters és mtsai., 1967b; Winters, 1976; Miyazato és mtsai., 1999). Azonban érdekes módon kísérleteinkben a VEP-ok is rendkívül érintettnek mutatkoztak (ld.: **5.12 ábra B és D**). Ez a jelenség hangsúlyozza a PnO fontos szerepét az agykéreg függő információ integráló kapacitás fenntartásában, ugyanis az kizárható, hogy a modellünkben a TTX-hatása közvetlenül érintse a

vizuális rendszer rostjait, vagy magjait, tehát az AEP válaszok eltűnésén túl a VEP válasz elmaradása csak az agykéreg állapotának megváltozásával magyarázható.



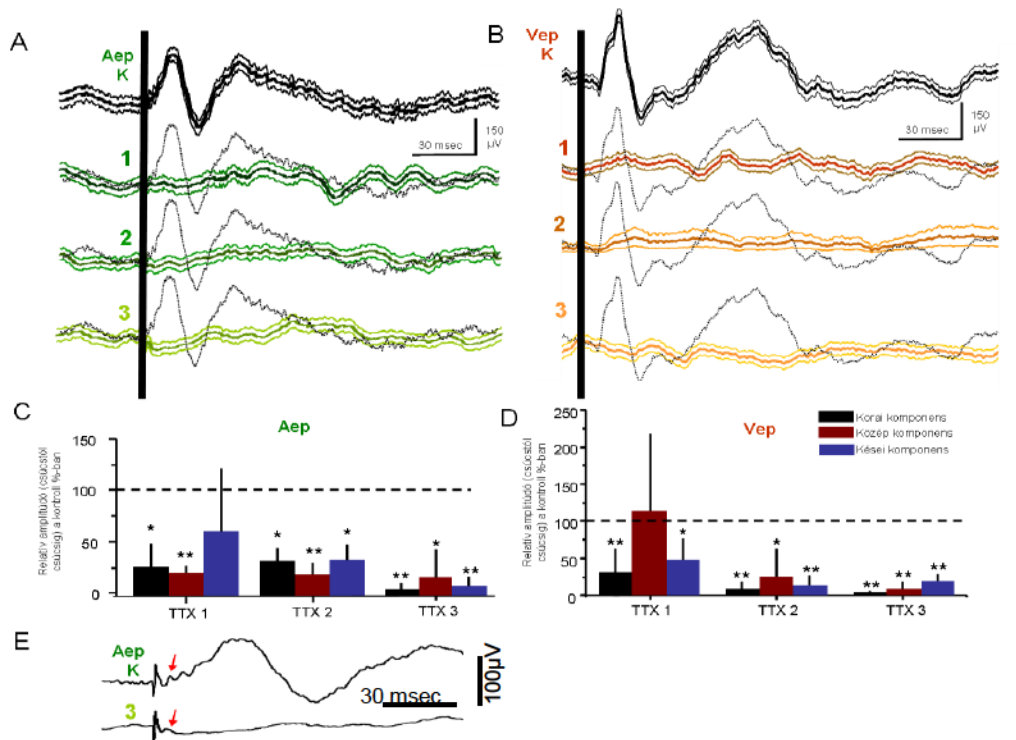
4.10 ábra A TTX (1 μ M) dialízise folyamán az EEG tartományok aránya jellegzetesen megváltozik. (A) Egy reprezentatív példa az EEG tartományok százalékos megváltozásáról és a kísérlet menetéről. Felül a második nyíl jelzi a TTX dializálásának kezdetét. Az alapvonalon levő téglalapok az AEP-ek és a VEP-ek mintavételezésének időpontjait jelzik (Id.: színkód és szám a 4.12 ábrán). A függőleges színkódolt vonalak jelzik azokat a 3 perces szakaszokat, amelyekből az átlagolt spektrumokat számoltuk (Id.: E). (B) A delta (0,5-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa (8-13 Hz) és béta (13-30 Hz) EEG tartományok megváltozása a saját kontrolljukra normalizálva (ACSF). (C) Az alacsony gamma (30-50 Hz) és a magas gamma (7-140 Hz) tartományok azonnal csökkenni kezdenek a TTX dialízisének kezdetétől és végig alacsony szinten is marad a kísérletben. (D) A ECoG amelyből a kalkulációkat végeztük. (E) A delta frekvencia tartománya a TTX dialízis (N=6) után 40 perccel (első oszlop) és két órával is szignifikánsan nagyobb teljesítményű volt, mint a kontroll szakaszban (* $p < 0,05$ MANOVA). Mindkét gamma tartomány relatív teljesítménye (magas és alacsony) rendkívül érintettnek mutatkozott (** $p < 0,01$) és lecsökkent a dialízis alatt (Id.: 4.11 ábra).

A dialízis alatt az állatok megrezzenési reakcióinak (Startle- reaction, STL) meglétét és mértékét is ellenőriztük. A TTX dialízis hatására ezek gyakorlatilag átmenet nélkül teljesen megszűntek (ld.: **5.12 ábra**). Mivel a megrezzenési reakciók megjelenése a PnC épségéhez kötött egyelőre nem lehet eldönteni, hogy elmaradásukat a dialízis során a PnC óriás sejtjeit ért direkt paralízis, vagy a PnO sejtjeinek esetleges potenciórozó hatásának elmaradása okozza-e. Felmerülhet az is, amit számos klinikai vizsgálat ki is használ (Simons-Weidenmaier és mtsai., 2006), hogy a megrezzenési reakciók épsége a „felsőbb idegi elemek” indirekt hatásához köthető. Bizonyított ugyanis, hogy az agy egyéb területeiről származó idegi hatások hatékonyan képesek gátolni az STL reakció motoros kimenetét, ezért gyakran használják PVS-es, vagy kómás betegek fiziológiás állapotának felmérésére is (Fins és mtsai., 2007; Owen és Coleman, 2008).

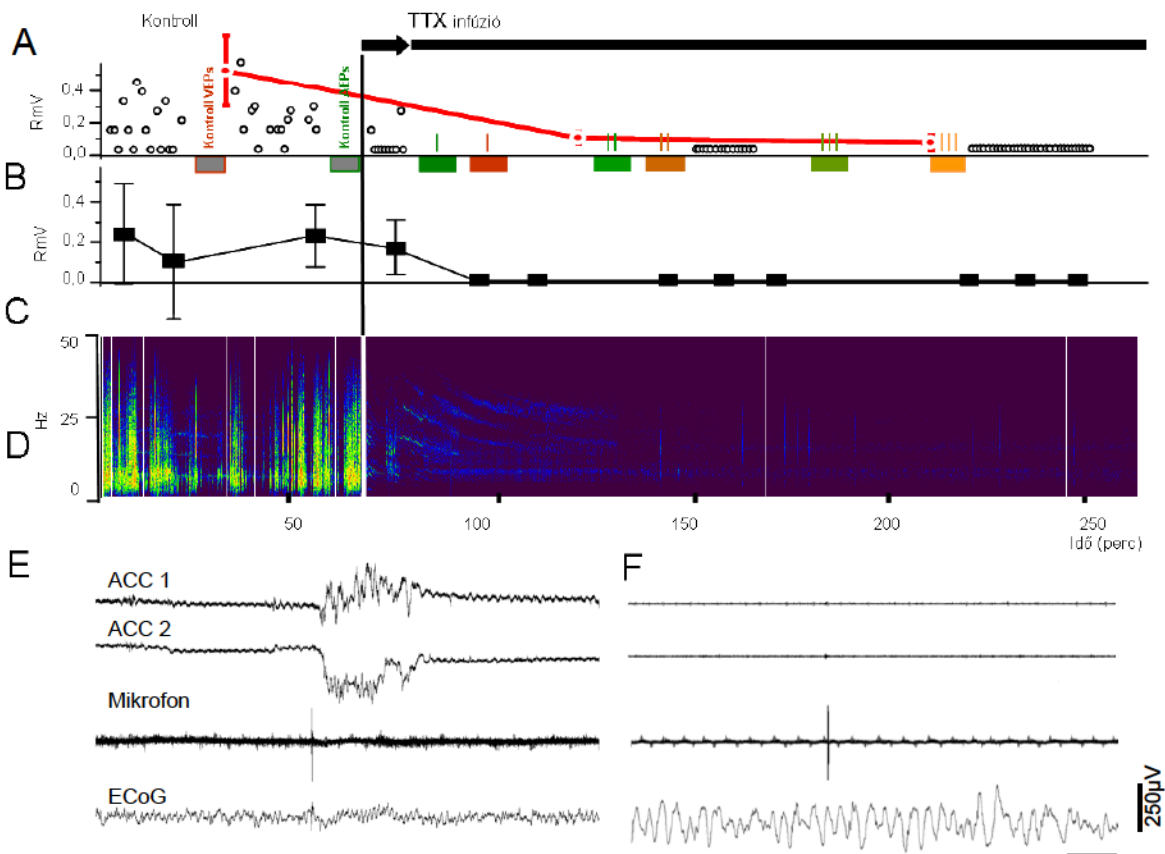


5.11 ábra Reprezentatív Wavelet analízis három húsz másodperces ECoG szakaszból. Jól látható, hogy a kontroll szakaszból vett analízis (balra) adta kép hogyan épül át a TTX mikrodialízis hatására egy korai (középen) és egy későbbi (jobbra) szakaszban. Jól kivehetően kiüresedik az EEG gamma tartománya, miközben a delta tartomány egyre inkább dominánsabbá válik. Ezt a színekódolt Wavelet transzformációk mellett megjelenített, az adott szakaszokból átlagolt, teljesítmény spektrumok (Fast Fourier Transformation, FFT) is mutatják. Az analízisek felett az adott 20 sec-os EEG szakasz látható, amelyből az analízisek készültek. Az ábrán legfölül a kóma állapotára jellemző 'amorfi' delta aktivitás figyelhető meg (Loeb, 1958).

A bemutatott mikrodialitikus kísérletben úgy gondoljuk, hogy állataink egy agytörzsi eredetű perzisztens, vegetatív jellegű állapotba kerültek, ahhoz rendkívül hasonlóan, mint amikor az MPTA-ba (mely tartalmazza a PnO-t) barbiturátot injektáltak (Devor és Zalkind, 2001). Mára bizonyított, hogy anesztézia alatt a PnO stimulációja hatékonyan növeli meg az MUA szintjét a parietális asszociációs és a vizuális kéregben is a sejtek tüzelési mintázatából számított interakciós entrópiát általánosan, és az információ-integráló kapacitást is a random módon adott vizuális ingerekre (Pillay, 2013). A mikrodialitikusan előidézett lokális paralízis, amely tudatvesztett állapotot okozott, úgy gondoljuk, hogy megerősíti a PnO alapvető szerepét az agykéreghez kötött szenzoros integráció fenntartásában. Megfordítva is igaz kísérleteink tükrében, hogy a PnO funkcionális kiesése dramatikusan lecsökkenti az agykéreg reaktivitását az auditoros és vizuális ingerekre.



5.12 ábra Az AEP-ok (A, C és E) és a VEP-ok (B és D) megváltozása a TTX dialízis alatt. (A és B) Az AEP-ok és a VEP-ok 100 db egyedi válaszból számított átlagolt alakjai az egyedi válaszok szórásával ábrázolva (a mintavétel időpontjait ld.: 4.10 ábra A). A TTX dialízis alatti átlagokra (1, 2 és 3) a könnyebb viszonyítás érdekében rárajzoltattuk a kontroll átlagát is. (C) Hat állat korai (8-40 ms), közép (40-80 ms) és kései (80< ms) válasz komponenseinek relatív megváltozása a kontrollhoz képest (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ MANOVA). (folytatás ld.: következő oldal).

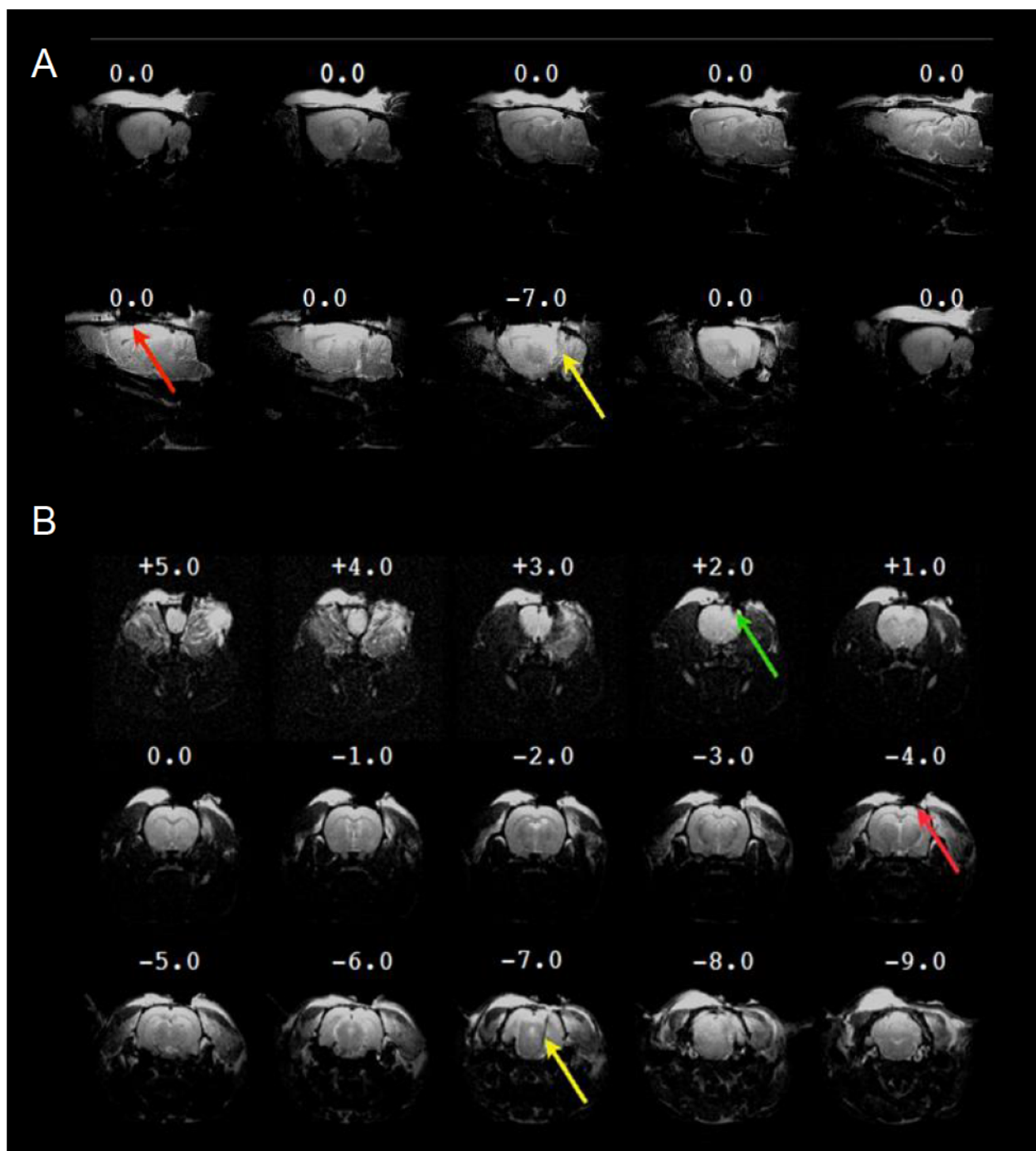


5.13 ábra A TTX okozta komatikus állapotban a megrezzenési reakciók nem kiválthatók. (A) Az akcelerométerrel regisztrált individuális megrezzenési reakciók körökkel ábrázolva a kísérlet folyamán (egy individuális megrezzenésre példát ld.: E). A hat állat megrezzenésének tizenötösével való átlagolása után a vörös vonal ezek mértékét mutatják a kísérlet alatt (\pm SD). (B) Az A ábrán reprezentatív megjelenített megrezzenéseinek átlagértékei (\pm SD). (C) Az akcelerométerrel folyamatosan regisztrált motilitás spektrografikus megjelenítése az időben. Jól kivehető az állat inaktivitása a TTX dialízis alatt. A dialízis kezdetor jelentkező remegés–szerű tremor is kivehető a TTX ‘probe’ behelyezése után. (E) A 3D akcelerométer két dimenziójának elmozdulását (szöggyorsulás) relatív mV-ban mérő görbéje. Jól látható a megrezzenési reakció, amely az alatta mikrofonnal mért inger, azonnal követi. Legalul a mérés alatti ECoG látható. Észrevehető, hogy a megrezzenési reakciót az EEG aktivációja is kíséri, mint az orientációra is jellemző theta aktivitás. (F) A kómához társuló atónia és jellemző delta aktivitás és a megrezzenési reakció elmaradása látható. Kalib.: 1 sec

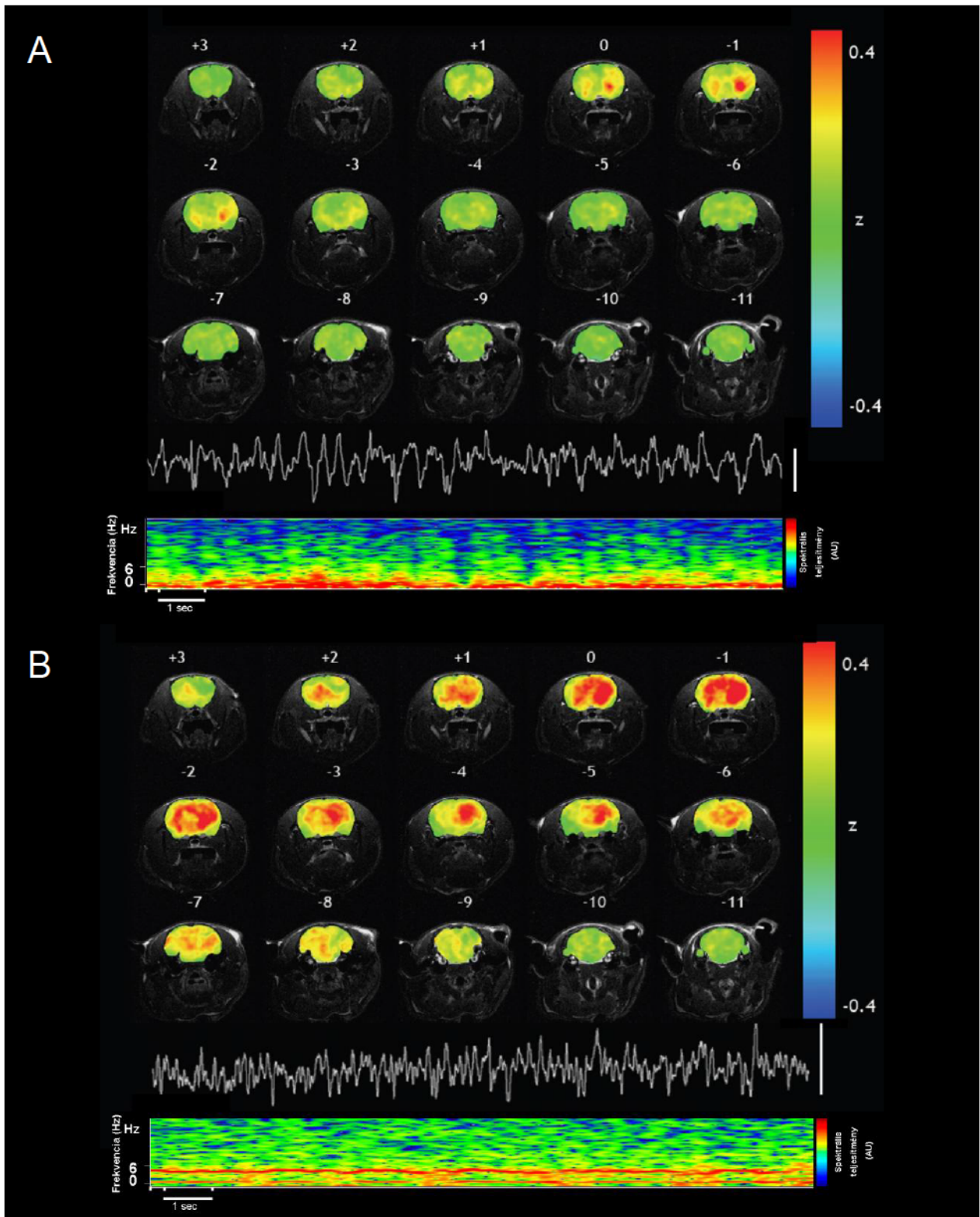
5.12 ábra folyt.: A VEP-ek esetében a korai válasz komponens elütő értékét a két állat esetében történt túl korai mintavétel magyarázhatja (még nem alakult kia ‘probe’ körül a kémiai egyensúly), azonban ez még a jövőben tisztázásra szorul. (E) Egy reprezentatív példa arról, hogy a TTX-hatás ellenére az AEP-ok thalamikus komponense ép marad, azaz a fő válaszkomponensek elmaradása ellenére az auditoros ingerek feltételezhetően eljutnak az agykéregig (Shaw, 1991).

5.6 A PnO magas frekvenciás stimulációjának hatására megnövekedik a funkcionális konnektivitás (FC) a frontális és paralimbikus kérgekben

Mivel az előző fejezetekben ismertetett eredményekből kitűnik, hogy a PnO-t alkotó sejtek nagy csoportja *arousal* függő és megfordítva, a PnO bilaterális paralízise, vagy az óriás sejtjeit ért excitotoxikus sérülés *status epilepticus* alatt komatikus állapothoz vezet, joggal feltételezhattuk, hogy az általános anesztézia állapotában is hatékonyan képes ébreszteni az agykérget. A bevezetőben már említettük, hogy számos adat van arra, hogy a PnO régiója fontos szerepet játszik a generális anesztézia kialakításában (Devor és Zalkind, 2001; Sukhotinsky és mtsai., 2007; Gili és mtsai., 2013). A metodikában ismertetett stimulációs kísérleti konstelláció, melyben a PnO stimulációja által perzisztensen deszinkron állapotban tudtuk tartani az izofluránban (1.1-1.3 MAO%) altatott állatok EEG-jét, miközben fMRI-BOLD képalkotást végeztünk az agyról, úgy gondoltuk, hogy alkalmas annak vizsgálatára is, hogy milyen agyterületek közreműködésével és milyen agykérgi területekre hat a PnO felszálló aktiváló hatása az FC szintjén. Fontos hangsúlyoznunk, hogy vizsgálatunk során FC-t mértünk, nem EC-t, ugyanis szubkortikális és agykérgi struktúrák BOLD aktivitásának funkcionális összehasonlítására ez az eljárás megbízhatóbb eredményeket ad, mind az EC, amelyik sokkal inkább alkalmas az intrakortikális BOLD aktivitás finom szerveződésének feltérképezésére (ld.: metodika). Forrás referenciánknak mi a Meynert-féle magot (Nucleus Basalis Meynerti, NBN) választottuk, mert az NBN szerepe bizonyított a generális anesztézia alatt létrejövő mikro-arousalok kialakításában (Pillay és mtsai., 2011). Természetesen az EEG és az fMRI-BOLD időbeli felbontása eltér egymástól, ezért egy olyan speciális átfedő kísérleti menetet fejlesztettünk ki, amely kihasználja, hogy a PnO EEG-t aktiváló hatása elhúzódó és nem csupán a stimuláció alatt jelentkezett az agykérgen (ld.: **1.6 ábra B** és metodika). Az állat fiziológiai paramétereit (ld.: metodika) folyamatosan monitoroztuk. Ez azért volt fontos, mert a stiumláció hatására fennállt az a veszély, hogy állataink vegetatív funkciói összeomolhatnak.



5.14 ábra Anatómiai MRI képek szagittális (A) és axiális (B) síkokból a stimuláció előtt. (A) Anatómiai feltáró felvételek szagittális síkokban a Bregmához viszonyítva. A metszetek tetején látható megnövekedett intenzitású mezőt a speciális záró cement adja. A piros nyíl az EEG-t regisztráló Pt elektród egyik ágát mutatja. A sárga nyíl a szén-üveg elektród kezdeti behatolásának pontos helyét mutatja a kéregben (ferde célzás ld.: [metodika](#)). (B) Koronális anatómiai felvételek axiális síkokból (\pm Bregma). A zöld és a piros nyíl az elvezető Pt elektród két ágát jelzi a kérgen. A sárga nyíl a ferde célzással implantált szén-üveg elektródot jelzi a PnO-ban.



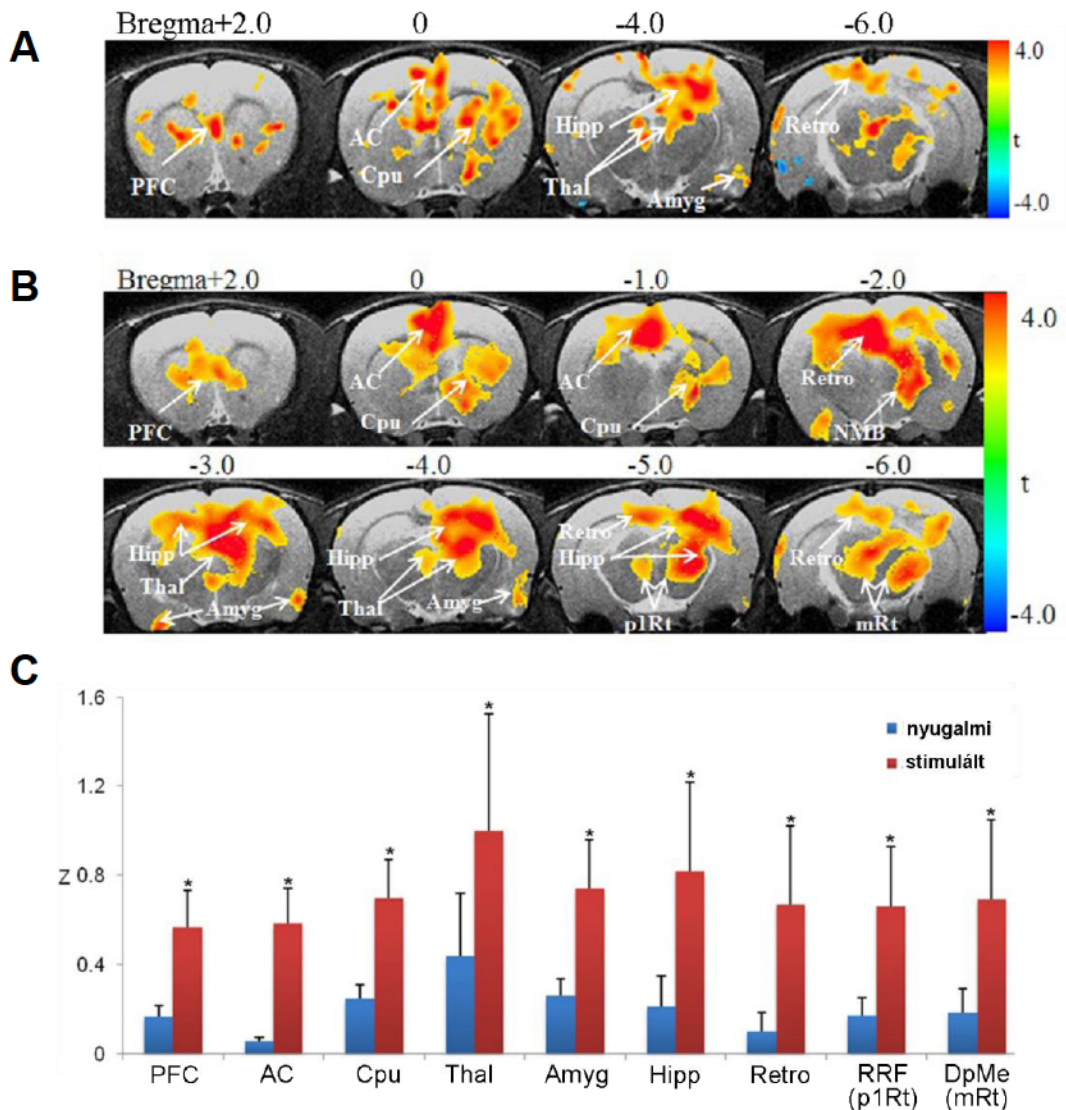
5.15 ábra Reprezentatív felvételek egy állatból a FC megnövekedéséről a forrás voxelekhez képest (NBM) a PnO stimulációjának hatására. (A) Pihenő helyzeti ('resting state') BOLD alapaktivitás és az alatta jellemző delta domináns EEG egy reprezentatív szakasza. (B) A PnO stimulációjának hatására deszinkronizálódott az EEG (ld.: alul a theta domináns EEG felvételt) és megnövekedett a FC a limbikus struktúrákban (a Fischer-féle Z transzformáció a korrelációs koefficiens relatív megváltozását mutatta a forrás voxelhez képest). Kalib.: 200 mV

Releváns eredményt az fMRI-BOLD FC értékek tekintetében ugyanis csak úgy kaphatunk, ha az említett paraméterek a kísérlet folyamán stabilan maradnak. Az fMRI mágnes alatt lévő speciális borító cylinder térbeli elhelyezkedése miatt EEG jeleket csak a frontális kéregről tudtunk elvezetni térbeli okok miatt (ld.: **5.14 ábra A és B**).

Az irodalomban ismeretes, hogy altatás alatt a PnO stimulációja különösképpen alkalmas a kéreg és a hippocampus theta aktivitásának indukciójára (Klemm, 1972b; McNaughton és Sedgwick, 1978). A kifejlesztett bipoláris szén-üveg elektródunkkal történt stimuláció a frontális kérgen mért mély altatásra jellemző delta állapotból hatékonyan indukált theta szinkronizációt (ld.: **5.15 ábra B**).

A 9 állat fMRI-BOLD technikával mért FC adatainak összehasonlításából kiderült, a PnO stimulációja kiterjedt FC növekedést indukált az agy számos helyén az EEG aktivációja közben. Az adatokat az **5.16 ábra** foglalja össze. Általánosan elmondható, hogy a tudatossággal összefüggésben lévő középvonali, ún. fronto-parietális „magas kérgék” aktiválódtak (Prefrontális Cortex, PFC; Anterior Cinguláris Cortex, AC) és meglepő módon a teljes limbikus rendszerben is FC növekedés volt megfigyelhető. A limbikus és paralimbikus érintettségéből ki szeretnénk emelni azt, hogy a hippocampus és az amygdala érdekes módon ipsilaterálisan aktiválódott. Ezt a jelenséget összehasonlítva a többi területtel, gyakran követte az NMB aktivációja is. Elnagyoltan az állíthatjuk, hogy a stimuláció hatása egyébként generalizáltan érintette a Caudo Putament, a thalamus-t, a szomatoszenzoros kérget és a középagyi *formatio reticularis*-t (ld.: **5.16 ábra**).

Úgy gondoltuk, hogy az stimuláció hatására megnövekedett FC elemzésével megvizsgálhatjuk, hogy az ARAS mely szubkorticális struktúrákon keresztül fejt ki aktiváló hatását? Általánosságban elmondható, hogy a PnO stimulációjára az FC aktivitás a thalamusban és a bazális előagyban is megemelkedett. Ez arra utalhat, amit a bevezetőben már ismertettünk, hogy az ARAS hatást ez a két struktúra párhuzamosan közvetíti az agykéreg felé.



5.16 ábra Átlagolt funkcionális (FC fMRI) aktivációs térképek a PnO stimulációja után. Összehasonlítva a nyugalmi állapottal szignifikáns BOLD aktiváció történt a prefrontális (PFC), anterior cinguláris (AC) és retrospleniális (Retro) kérgekben, a caudo putamen –ben (Cpu), a thalamus-ban (Thal), a hippocampus-ban (Hipp) és a *formatio reticularis* középagyi régióiban (retro-rubrális mező RRF (ekv.: pIRt) és DpMe (ekv.: mRt)). (A) Három propofollal altatott állat átlagolt FC fMRI térképe (a FC $0,18 \pm 0,10$ –ról megnövekedett $0,49 \pm 0,21$ korrelációs koefficiens értékre). (B) Kilenc állat átlagolt FC fMRI térképe izoflurán altatásban (1.1-1.3 %). Látható, hogy a két anesztézia típus hasonló aktivációs képet adott a stimuláció hatására, amely bizonyítja, hogy az anesztézia típusa nem befolyásolja a stimuláció (300 Hz, 5-7 V, 0,1 szélesség/impulzus, 3 sec hossz) okozta FC fMRI térképet (a propofollal altatott esetben a kisebb szignifikáns FC növekedési terület a kis állatszám miatt van). A Korrelációs Koefficiensek értékein Fischer-féle Z (Z) transzformációt hajtottunk végre és a csoportok átlagolt FC térképének generálásakor egy mintás t-tesztel (t) állapítottuk meg mind a negatív (kék) és pozitív (piros) értékeket. A korreláló voxeleket (FC) $p < 0,05$ küszöbnél tekintettük szignifikánsnak.

Mivel a limbikus rendszer meglepő módon különösképpen érintett volt az FC szintjén az EEG aktivációjakor, felmerülhet, hogy az általános anesztézia folyamán létrejövő amnéziát a PnO és a limbikus rendszer funkcionális szétkapcsolása okozhatja. Fordítva, azon néhány esetben, amikor az általános anesztézia után a páciens álmokképekről, vagy az anesztézia során szerzett egyéb percepciók élményekről számol be, feltehetőleg ezeket a PnO-ból eredő és a limbikus rendszerre ható *mikroarousal* okozhatta az anesztézia folyamán.

Az, hogy a PnO stimulációja a tudatos állapot fenntartásában alapvető szerepet játszó középvonali kérgék között is megnövekedett, aláhúzza a PnO kruciális szerepét a tudatos állapot fenntartásában és szervezésében. A fronto-parietális-occipitális kéreg kapcsolatának felbomlása ugyanis a tudatvesztés valószínű végső oka (Hipp és mtsai., 2011; Supp és mtsai., 2011; Hipp és mtsai., 2012). Újabb adatok szerint a perzisztens vegetatív állapotból, vagy kómából visszatérőkben a frontális kéregből EEG-vel és kiváltott válaszokkal megfigyeltek egy „feed-back” választ parietális és a temporális kérgék felé (Miller, 2011), mely a részletezett JPSTH analízishez hasonló, de mezőpotenciálokra alkalmazott effektív konnektivitás növekedést jelentett (Rosanova és mtsai., 2012). Mivel ezt olyanokban figyelték meg, akikben a teljes tudatvesztésből részlegesen elmozdultak és képesek voltak minimális válaszdásra bizonyos ingerekre, úgy gondolják hogy a funkcionális kapcsolat a frontális és parietális kérgék között a tudatos állapot első mérhető jele a kómából gyógyulóknak (Rosanova és mtsai., 2012). Mivel a mi PnO stimulációs paradigmánkban a FC a frontális és a cinguláris, valamint a retrospleniális kérgék között szignifikánsan megnövekedett, úgy gondoljuk, hogy a PnO a különböző típusú tudatvesztéssel járó állapotok (MCS, PVS stb.) egyik hatékony mély-agyi stimulációs terápiás célpontja lehet annál is inkább, mert emberben a baziláris artérián keresztül könnyen a PnO közelébe lehet vezetni a stimuláló elektródot.

6. ÁLTALÁNOS KÖVETKEZTETÉSEK

Főbb eredményeinket az előzetes kérdésfelvetéseink alapján a következőképp foglalhatjuk össze:

- A hídi *formatio reticularis* gigantocelluláris állománya az SE állapotában szelektíven szenved hisztopatológiailag kimutatható sérülést az SE kiváltásának módjától függetlenül. Az ARAS órás sejteinek 'sötétté' válása epilepsziás tolerancia kialakulása ellenére is megtörténik az SE progressziója során (Baracska és mtsai., 2009).

- Az órás sejtek patológiás állapotba kerülése az SE Treiman-féle skála 4. vagy 5. fázisában (Treiman és mtsai., 1990) jelentkezett, mely fázisokban az EEG lassú epileptiform aktivitást mutatott, melyhez az állatok tudatvesztéses atóniája társult (Baracska és mtsai., 2009). Mivel az 'sötét' órás sejtek ép szöveti környezetben mutatkoztak ezért, feltételezhetően ezek funkcionális hanyatlása (kimaradó *arousal*) okozhatta az agykéreghez kötött tudatosság elvesztését.

- A szabadonmozgó állatok PnO-jából elvezetett neuronok aktivitásából kitűnt egy rendkívül széles eAP-okkal rendelkező populáció, amelyet mi órás sejtektől származónak gondolunk. Ezen 'spike'-ok aktivitása ébrenlétben, annak is különösen az aktív fázisában volt a legmagasabb. A PnO-ból meglepetésre sikerült elvezetni számos kis amplitúdójú, keskeny/szimmetrikus eAP alakkal rendelkező, feltételezhetően interneuron jellegű sejtet is. A CCG analízis az órás sejt-interneuron kapcsolatnak alapvető szerepet tulajdonított az alvás-ébrenlét szabályozásban, mivel a monoszintaptikus kapcsolataik erőssége állapotfüggő változásokat mutatott. Ezenkívül ráirányította a figyelmet arra, hogy a PnO órás sejtei nem egyszerűen aspecifikusan „detonálják” (deszinkronizálják) az agykérget, ahogy azt eddig gondoltuk, hanem egy lokális interneuron rendszer is jelen van a hídban, mely finoman szabályozza a kortiko-retikuláris kapcsolatokat.

- A PnO-ba mikrodialitikusan beadott TTX azonnali tudatvesztéssel járó perzisztens vegetatív állapotot okozott. Mivel az SE alatt az órás sejtek szenvedtek szelektív patológiás sérülést és a TTX-el a PnO állományát

paralizáltuk, feltételezhető, hogy a komatikus állapot létrejöttének az óriás sejtek arousal közvetítő hatásának kiesése a végső oka. A TTX paralízis bizonyítja, hogy a PnO képes közvetíteni a tudatos és tudatvesztett állapotok közti váltást (pl.: alvás/ébrenléti ciklus alatt).

- Az SWS/W átmenetben a PnO óriás sejtjei emelik meg először a tüzelési rátájukat. Ez értelmezhetővé teszi az ébredésben és az akaratlagos mozgások inicializálásában betöltött fontos szerepüket.

- A PPTg kolinergiás szinaptikus hatásait nem sikerült kimutatni a PnO interneuronjain. Ennek sikertelensége részben anatómiai, részben statisztikai okokra vezethető vissza.

- A PnO stimulációjának hatására a frontális, anterior cinguláris és a retrosplenialis kérgék között nőtt meg a FC (fMRI-BOLD) szignifikánsan, melyhez az EEG deszinkronizációja társult. Mivel ezeknek a kérgeknek a funkcionális kapcsolata a tudatos állapot esszenciális feltétele (Raizada és Poldrack, 2007; Alkire és mtsai., 2008; Boly és mtsai., 2011; Supp és mtsai., 2011; Hipp és mtsai., 2012), úgy gondoljuk, hogy a PnO retikulo-kortikális hatásai hatékonyan szervezik össze ezen középvonali kérgék információ integráló kapacitását. A kísérlet felveti továbbá, hogy PnO-ból eredő és az EEG szintjén generálisan jelentkező *arousal* funkcionálisan csak bizonyos kéreg területekre hathat.

- A PnO aktiváló hatása a FC szintjén egyszerre kimutatható volt a bazális előagyban és a thalamusban is. Eszerint az ARAS hatások e két struktúrán keresztül egyaránt aktiválják a nagyagykérget.

Kísérleteinkben az ARAS általános aktivációját, vagy általános anesztézia alatti indukcióját vizsgáltuk különböző kontextusokban. A kísérleteket az köti össze, hogy az ARAS magjai közül az egyik feltételezett, de eddig még nem kellőképpen megvizsgált kulcsszereplőjét, a PnO-t vizsgáltuk kiemelten. Figyelmünk azáltal terelődött a PnO-ra, hogy az SE létrejöttéhez társuló tudatvesztés során az ARAS magjainak óriás sejtes állománya, ezen belül is

leginkább PnO területén levő sejtpopuláció szenvedett szelektív excitotoxikus sérülést.

Az óriás sejtek patológiás állapotba kerülését a Gallyas-féle sötét sejt ezüstözéssel mutattuk ki. Számos esetben igazolt, hogy ebben a hisztopatológiailag iniciális állapotban lévő sejtek képesek regenerálódni, különösen akkor, ha a körülöttük lévő ép szöveti szerkezetben hálózatosan kerültek sötét sejt állapotba (Csordas és mtsai., 2003; Gallyas és mtsai., 2006; Gallyas és mtsai., 2008). Mivel a vizsgált agytörzsi régióban ezen hálózat szelektíven volt érintett (ld.: **5.1**, **5.2** és **5.3 ábra**), ép szöveti környezetben úgy gondoljuk, hogy ezek a sötét óriás sejtek elméletileg tartozhattak a sötét sejtek regenerálódó típusához is. Ez azért fontos, mert ismert az a jelenség, hogy posztiktálisan mind állatkísérletekben, mind humán klinikai eseteket tekintve létrejöhet kómás állapot még mielőtt visszatérne a normál fiziológiás működés (Curia és mtsai., 2008). Teoretikusan elképzelhető, hogy ezen lassú hullámú EEG aktivitással rendelkező posztiktális állapot alatt a gigantocelluláris rendszer sejtjeinek kritikus száma még sötét sejt állapotban lehet. Ezen állapot megszűntekor tér vissza a roham utáni normál tudatos állapot. Érdekes módon humán esetekben megfigyelték, hogy polio fertőzés után egy ún. post-polio szindróma léphet fel, amelyhez krónikus fáradtság társulhat. A post-polio-s fáradtságban szenvedőkben néhány adat szerint a *formatio reticularis*-ban kisebb mérvű léziókat figyeltek meg (Bruno és mtsai., 1994; Bruno és mtsai., 1995). Néhányaknál az epilepsziás roham után a polio szindrómához hasonló posztiktális fáradtság lép fel, mely a klinikai gyakorlatban segít elkülöníteni az epilepsziás és a nem epilepsziás rohamokat abban az esetben, ha a páciensről nem készítettek poligráfias felvételeket (Ettinger és mtsai., 1999). A posztiktálisan létrejövő fáradtság is utalhat a hídi *formatio reticularis* fontos szerepére a különböző epilepszia fajták generalizációjában.

Agytörzsi kóma nem csak trauma, stroke, vagy egyéb módon szerzett lézió következtében jön létre, hanem számos olyan esetben is, amikor az adott szervezet metabolikusan omlik össze (Kaplan, 2004). Ezen kómák létrejöttének megértése nagy kihívást jelent a klinikai gyakorlatban. Ugyanakkor számos

humán *in vivo* MRI spektroszkópiás megfigyelés számol be arról, hogy ezen kómásoknak agytörzsében kiterjedt lézióval nem járó, diffúzan létrejött finom szöveti sérülések állnak, melyek a PnO területére lokalizálódtak (Watanabe és mtsai., 2004). Vizsgálatainkban az SE alatt létrejövő tudatvesztett állapothoz kapcsolt sejttípus specifikus sötét sejtesedés elméletileg magyarázhat egy ilyen az N-acetil-aszpartát/kreatin arány ('NAA/Cr ratio index') csökkenésében tetten érhető szöveti elváltozást. Ily módon feltételezhető, hogy a különböző agytörzsi kóma-típusok kialakulásához az óriás sejtes rendszer szelektív sérülése is elegendő, de természetesen ennek bizonyításához további kísérletek kellenek.

Újabb adatok szerint az agytörzsben és a nyúltvelőben lévő óriás sejtek elektromos szinapszissal (konnexin 36) egymással szorosan össze vannak kötve (Martin és mtsai., 2011). Mivel a rés-rés kapcsolatokon keresztül egy adott hálózatban az elektromos impulzusok nagyon hatékonyan terjednek, úgy gondoljuk, hogy az SE alatt létrejövő extrém szenzitivitás, mely a sötét sejtesedésben érhető tetten, ennek a jelenségnek a számlájára is írható. Az agytörzsi gigantocelluláris hálózat sejteinek masszív összekapcsoltsága valószínűleg rendkívül fontos funkcióinak ellátásához, ugyanakkor ezen jellege kifejezetten esendővé teszi az excitotoxikus stresszel szemben. Ez egyben utal az óriás glutamáterg sejtek körül lévő lokális gátlórendszer - mely az egész rendszert szabályozza és stabilizálja - épségének fontos szerepére.

Szabadon mozgó állatokon elvégzett mikroelektrofiziológiai kísérleteink a mediális PnO óriás sejteinek fontos szerepét igazolták az állatok vigilanciájának szabályozásában az alvás-ébrenléti ciklus folyamán. Ezek a sejtek ébrenlétkor és REM alvás alatt is fokozott aktivitást mutattak, különösen az aktív ébrenlét alatt az akaratlagos mozgásokhoz köthetően. Mivel az intencionális mozgások inicializálását agykérgi területek végzik és kísérleteinkben a PnO óriás sejtei aktív ébrenlétben voltak a legmagasabb tüzelési rátával jellemezhetők, ez azt feltételezi, hogy a PnO óriás sejtes rendszerének működése az irányított mozgások alatt különösen erős kölcsönhatásban van az említett kérgi régiókkal. Ennek a kapcsolatnak az anatómiai és fiziológiai feltérképezése rendkívüli

jelentőséggel bírna különösen annak tükrében, hogy a PnO-ról bizonyított, hogy a frontális kérget direkten is innerválja (Sukhotinsky és mtsai., 2007).

Az ARAS klasszikus magjaiban talált különböző sejttípusok karakterizálásuk során nagy heterogenitást mutattak abban, hogy az alvás-ébrenléti ciklus mely fázisában voltak különösen aktívak (**5.5 ábra**). A DpMe principális jellegű sejteknek besorolt állományában kísérleteinkben egyelőre nem sikerült olyan idegsejteket karakterizálni, amelyek lassú hullám alvás alatt szignifikánsan megemelték volna tüzelési rátájukat. Számos új eredmény azonban bebizonyította, hogy ezen régióban komoly SWS-ON sejtpopuláció is jelen van. A dolgozatban a DpMe-ből mért 26 db interneuron aktivitását egyelőre nem soroltuk alvás-ébrenléti ciklusokhoz. Feltételezhető tehát, hogy a mások által leírt lassú hullámú alvás alatt aktív idegsejtek ezeknek az interneuronok típusába sorolhatók. Fontos megjegyeznünk azonban, hogy a DpMe principális jellegű sejteinek nagy hányada (ld.: **5.5 ábra**) (amelyeket mi itt állapotfüggetlennek vezettünk be) nem szignifikánsan, de magasabb aktivitással rendelkeztek SWS alatt. Ez a jelenség ráirányítja a figyelmet arra, hogy a kategorizálás, amelyet az eAP-k alakja alapján hoztunk meg ebben a dolgozatban, nem száz százalékosan általánosítható az agytörzsi régióban. Ugyanis az, hogy a DpMe-ben volt egy jelentős, általunk principális jellegűnek besorolt sejtpopuláció, amely SWS-ON volt, felveti, hogy vannak olyan GABA-erg sejtek az agytörzsi *formatio reticularis*-ban, amelyeknek eAP formája hasonlít azon sejtek eAP-jához, melyeket mi principális jellegűnek vezettük be. Fontos új eredmény, hogy a PnO-ban sikerült elvezetnünk egy rendkívül heterogén tüzelési karakterisztikájú, feltételezhetően lokális interneuronoknak tekinthető sejtpopulációból. A theta aktivitás keletkezéséhez kapcsolódó irodalom a PnO sejteit általánosságban tónikus tüzelési karakterisztikával jellemezte (Vertes, 1982; Vertes és Kocsis, 1997). Kísérleteink alapján ezek a tónikus sejtek interneuron jellegűek és a bevezetésben említett II-es típushoz tartoznak, nem pedig principális jellegűek. Fontos hangsúlyoznunk azonban, hogy az óriás sejteken kívül mind a lokális interneuron jellegűek, mind pedig a principális jellegűnek mondott idegsejtek komplexen változtatták meg tüzelési aktivitásukat az alvás-ébrenléti ciklus alatt.

Mi az *arousal* közvetítésének szempontjából az agykéreg felé különös jelentőséget tulajdonítottunk a PnO óriás sejtjeinek, amelyekről egy példa kapcsán (ld.: **5.8-5.9 ábra**) bizonyítottuk, hogy SWS/REM átmenetben nem csak rátájukat, hanem működési jellegüket is megváltoztatták. Fontos aláhúznunk ugyanakkor, hogy a REM alvás alatt a PnO általunk principális jellegűnek besorolt idegsejtjei között volt olyan, amelyik szignifikánsan megemelte tüzelési rátáját, míg a PnO óriás sejtjei egy átmeneti állapotot képviseltek a W-ON és REM-ON között. Ez azt is jelenti, hogy a REM indukció ezeken a feltehetőleg közepes sejtmérettel rendelkező idegsejteken keresztül is megvalósulhat.

Mivel az általunk lokális interneuronoknak besorolt idegsejtek a PnO-ban nagy heterogenitást mutattak aszerint, hogy mely alvás-ébrenléti ciklusban voltak fokozottan aktívak, feltételeztük fontos szerepüket a lokális hálózat szabályozásában. Emiatt azokban az esetekben, amelyekben sikerült parallel elvezetni a különböző sejtípusokat, megpróbáltunk monoszinaptikus kapcsolatokat feltérképezni. Ez néhány esetben sikerült is, amelyek közül a PnO óriás sejtjeinek és interneuronjainak kapcsolatára koncentráltunk. A statisztikai eloszlásban jellemzően ezen két sejtípus közt találtunk számosabb monoszinaptikus kapcsolatot, ami populációsan azt sejteti, hogy a lokális interneuronok szabályozó szerepüket a nagy sejtek aktivitásának befolyásolásán keresztül fejthetik ki. Fontos új eredmény, hogy a monoszinaptikus kapcsolatok a rövid távú 'spike' átviteli hatékonyságukat (CS) és dinamikus effektív konnektivitásukat (EC) is állapotfüggően változtatták meg az alvás-ébrenléti ciklus alatt. Fontos hangsúlyoznunk, hogy ez nem magától értetődő, ugyanis néhány kísérletben, amelyben a Gi-ből vezettek el parallel idegsejteket felületes altatásban és ketamin anesztéziában, a CCG analízisben e két állapot között nem változott meg a Gi sejtek összekapcsoltsága (McGaraughty és Reinis, 1993). Az, hogy mi az alvás-ébrenléti ciklusban a monoszinaptikus kapcsolatok alatt állapotfüggő változást írtunk le, megerősíti a PnO óriás sejtjeinek és interneuronjainak az alvás szabályozásban betöltött fontos szerepét.

A PnO óriás sejtjei és az interneuronok kapcsolata bonyolult, de egyelőre még kivizsgálatlan módon változott meg. Úgy gondoljuk, hogy ezen átmenet alatt

az óriás sejt és az interneuronok excitatorikus és inhibitorikus kapcsolatainak egyensúlya megváltozik, és különböző szinten stabilizálódik. Ez az átmenet nem dramatikus, hanem lassabban következik be, ami értelmezhetővé teszi, hogy az SWS/REM állapot közti váltás átmeneti szakaszokon keresztül zajlik. A jövőben mindenképpen szükséges lesz a parallel elvezetett sejtek tüzelését komolyabb analízis alá venni ebben az átmeneti állapotban.

A PnO-ba dializált TTX állatainkat PVS állapotban kényszerítette, melyhez az agykérgi reaktivitás szinte teljes megszűnése járult. Számunkra a vizuális kiváltott válaszok szignifikáns eltűnése azonban nehezen magyarázható. Az bizonyított, hogy az ARAS sejtjei az agykérgen generálisan megjelenő elektrofiziológiai jeleket, így az epilepszia különböző típusai alatt létrejövő paroxizmális EEG aktivitást (Kohsaka és mtsai., 1999; Kohsaka és mtsai., 2001; Kohsaka és mtsai., 2002) és az auditoros kiváltott válaszokat (Winters és mtsai., 1967a) is potenciózzák. Az agytörzsi potenciózó hatás kimaradása az AEP-kon klinikai gyakorlatban diagnosztikai jelentőségű (Galambos és Despland, 1980; Courchesne és mtsai., 1984; Lincoln és mtsai., 1986). Az, hogy a vizuális kiváltott válaszokra az agytörzs jelentős hatással bírna, ez idáig még nem volt bizonyított. Elméletileg elképzelhető az, hogy a dorsalis és medialis raphe mag (MnR) retinopetalis rostjain keresztül az ARAS már a retina szintjén blokkolja a kóma alatt az információ továbbítást, azonban ez nem valószínű, mivel mindkét modalitású inger (AEP, VEP) thalamikus komponensének jelenlétét számos kiváltott válasz sorozatban detektálni tudtuk a kóma-szerű állapot alatt is (ld.: **5.12 ábra E**). Ez arra utal, hogy a szenzoros információk eljutottak a thalamusba, azaz a vizuális kiváltott válaszok elmaradása nem a felszálló idegi-impulzusok blokkolásával, hanem az agykéreg reaktív állapotának elvesztésével magyarázható. Fontos megemlékeznünk a bevezetésben felvázolt jelenségről (ld.: **1.19 ábra**), hogy a nyúltvelő óriássejtes hálózata a vizuális kiváltott ingerekre kis mértékben ugyan, de válaszolt. Ez a jelenség a kiváltott válaszok komplex szerveződésére utal az agykéreg és az agytörzsi *formatio reticularis* között. Ezek szerint az ARAS nem csak az epilepsziák, hanem a legkülönbözőbb

szenzoros modalitások által kiváltott válaszok generalizációjában is alapvető szerepet vállal.

Egy általunk kifejlesztett speciális, bipoláris szén-üveg elektróddal sikerült megvalósítani azt, hogy mély agyi stimulációt hajtsunk végre általános anesztéziában a PnO-ban úgy, hogy mindeközben a stimuláció hatására bekövetkező FC változást fMRI-BOLD képalkotással és EEG regisztrációjával monitorozzuk. A kísérletek bebizonyították, hogy a PnO felszálló hatásait mind a thalamuson, mind a bazális előagyon keresztül párhuzamosan közvetíti az agykéreg felé. Fontos hangsúlyozni, hogy természetesen az FC szintjén megjelenő aktiváció, amely azt feltételezi, hogy az adott struktúrák között információ folyik, nem tükröz anatómiai viszonyt, tehát nem zárja ki azt, hogy a PnO direkten is modulálja az agykérget. A PnO projekcióinak pontos anatómiai feltérképezésére ezért rendkívüli igény van. Az fMRI-BOLD aktivitás bizonyította, hogy a PnO stimulációja hatékonyan növelte meg az NMB és az ún. középvonali kérgék közti FC-t. Az a tény, hogy az FC azon kérgék között növekedett meg a PnO stimulációja alatt, amelynek funkcionális kapcsolata alapvetően szükségesek a tudatosság meglétéhez, bizonyítja, hogy a PnO, mint az ARAS kulcsszereplője, képes befolyásolni a váltást a tudatos és a nem tudatos állapotok között. Azon patológiás (SE és kóma) és fiziológiás (SWS) állapotok, melyek során a PnO sérül, vagy működésének inaktivációja fordul elő, aláhúzzák a PnO épségének fontos szerepét a tudatosság általános fenntartásában.

A kísérlet az általános anesztézia alatti mikroébredésekre és álomképekre is szolgáltat egy lehetséges magyarázatot. E szerint elképzelhető, hogy a PnO egy átmeneti felszálló aktiváló hatása rövid időre az általános anesztézia ellenére lehetővé teszi az említett struktúrák közötti információ áramlást és ezáltal mikroébredést, vagy olyan álomképek létrejöttét okozhatja, amelyre az anesztézia után a páciens emlékezik. Az, hogy ezt a hatást (memória) a PnO, és nem a basalis előagy okozhatja, azért is valószínű, mert az említett magasabb kérgéken kívül a PnO stimulációjának hatására a hippocampus és a limbikus rendszer közti fMRI-BOLD aktivitás is megnövekedett az FC szintjén. Az, hogy a memória és az álomképek létrejöttében a hippocampus és a limbikus rendszer

alapvető szerepet játszik, közismert. A hippocampusban és az amygdalában az FC mértéke sokszor csak ipsilateralisan növekedett meg, ami azt jelenti, hogy a PnO hatásai a limbikus rendszerben nem feltétlenül generalizálódnak. Ahogy már említettük, ez mindenképpen szükségessé teszi a PnO-nak, mint projektáló struktúrának tüzetesebb anatómiai feltérképezését.

A tudatossághoz kapcsolódó magasabb humán vonatkozású pszichológiai tartalmak kisebb mértékű szétesése az olyan pszichés betegségekben, melyekhez tudatzavar is társulhat (pl. skizofrénia), elméletileg elképzelhető úgy, hogy ez az agykéreg-agytörzs funkcionális kapcsolat bomlik fel kisebb mértékben.

Penfield megállapítása, miszerint az agykéreg funkcionálisan nem szeparálható azon szubkortikális struktúráktól, amelyek biztosítják a felszálló aktiváló hatásokat, igaznak bizonyult, sőt megállapíthatjuk, hogy az agykéreg és az ARAS egy működési egységet alkot. Ebben a működési egységben az információt hordozó idegi impulzusok rendkívül bonyolult szerveződésben folyamatosan úton vannak és az alvás-ébrenléti ciklusban működési módot váltva más-más egyensúlyban stabilizálódnak, míg a patológiás folyamatok, vagy az anesztézia alatt megszűntük a tudat állapotának elvesztését eredményezi.

7. KORLÁTOK ÉS KITEKINTÉS

Fontos megjegyeznünk néhány olyan metodikai kényszer, mely arra int minket, hogy a kapott eredmények tükrében meghozott konklúziókat csak fenntartásokkal fogadjuk el.

A szabadon mozgó állatokban való eAP-k elvezetésének metodikája (Si - elektród) nem teszi lehetővé az elvezetett sejtek anatómiai azonosítását, emiatt arra kényszerültünk, hogy az elvezetett egysejt aktivitásokat csak az eAP-k alapján kategorizáljuk. Azonban elméletileg egy eAP alakját nem csak egy sejt sejttestjének mérete és morfológiája, hanem az elektród és a közte lévő kapcsolat relatív helyzete is megszabhatja (Henze és mtsai., 2000; Gold és mtsai., 2006). Ez különösen kihat az eAP-k amplitúdójára, ezért mi a PnO óriás sejtjeit a PD és ND alapján igyekeztünk szeparálni, ugyanis e kettő jellemző sokkal jobban tükrözi egy adott sejt azon elektromos belső tulajdonságait, amelyek végül egy eAP formáját megszabják. Még mindig megállapíthatjuk azonban, hogy az ND és PD alapján a PnO óriás sejtnak besorolt állománya jobban elütött a többi vizsgált sejtcsoporttól. Éppen ezért az egyéb principális jellegű és lokális interneuronnak általunk besorolt kategóriák valójában átfedhetnek egymással, és az általunk használt terminológia, mely a hippocampusból vagy a kéregből származik, ráerőltetettnek is tekinthető. Ez a jelenség annál is inkább létrejöhet, mivel ezzel a módszerrel nem eldönthető egy általunk interneuronnak besorolt sejtről, hogy lokális, vagy projekciós jellegű-e, ugyanis projekciós GABA-erg sejtek nagyobb sejttesttel, azaz eltérő eAP formával is rendelkezhetnek, mint a lokális interneuronok. A PnO GABA-erg sejtjeinek ilyen fajta anatómiai kivizsgálása még várat magára. Emiatt az általunk PnO interneuronoknak tekintett sejtekről a mi módszerünkkel nem dönthető el teljes biztonsággal, hogy lokális, vagy projektáló típusok-e. Ennek a jelenségnek az altatásban történő speciális kompozit elektróddal való kivizsgálása elengedhetetlen lesz. Ebben a kísérleti felállásban egy adott sejtben egyszerre vezethetünk el intracellulárisan és extracellulárisan, és megismerhetjük, valamint összehasonlíthatjuk a kétféle AP viszonyát. Amíg ez a vizsgálat nem történik

meg, az általunk bevezetett sejt kategóriák oktrojáltnak tekinthetők, azonban úgy gondoljuk, hogy ha az óriás sejteket optogenetikusan szelektíven stimulálnánk, akkor a stimuláció egyértelműsítene a PnO óriás idegsejtjeinek tényleges hatását szabadon mozgó állapotban.

Ismert, hogy a CCG analízisben a gátló kapcsolatok feltáratlanul maradhatnak. Ehhez hozzájárul az is, hogy a CCG páronkénti analízisében egy lehetséges bemenő harmadik hatás is rejtve maradhat (Gerstein és Perkel, 1969; Aertsen és Gerstein, 1985). Ennek tükrében a CCG analízis eredményeit a fenti eredmények tekintetbe vételével kell diszkutálni.

A TTX mikrodialízissel történő beadásánál fontos hangsúlyozni, hogy az MnR (mediális raphe) állományába implantáltuk a mikrodialitikus 'porbe' aktív felületét, ezáltal az általunk kalkulált érintett területben az itt jelenlévő, főleg szerotonerg sejtek is paralizálódtak, azaz a megjelenő fiziológiai hatások részben az ő számlájukra is írhatók. Mivel a megrezzenési reakciók a mikrodialízis kezdetekor szinte azonnal eltűntek a kontrollal összehasonlítva, nem kizárható, hogy a PnC óriás sejtjei (ezek közvetítik a reakciót kiváltó idegi hatásokat a gerincvelő felé) közvetlenül is érintettek. Ebben az esetben a megrezzenési reakciók elmaradását nem a PnO óriás sejtjeinek PnC óriás sejtjeire ható bemeneti hatásainak a paralizáció okozza, hanem a reflexkört direkt mediáló PnC is érintett lehet a bénulásban. Ez mindenképp felveti, hogy a TTX-et a mikrodialízis során kisebb koncentrációban is kipróbáljuk, vagy muscimol-ra cseréljük. A muscimol azért is lehet potenciális jelölt a mikrodialízisre, mert a TTX-el ellentétben a rostvezetést nem blokkolja, azaz az agytörzsön esetlegesen keresztülmenő ingerületeket érintetlenül hagyná. Itt kis kitérőként jegyezzük meg, hogy a 6 állatból, amelyekben egyszerre volt jelent az agytörzsben a Si-elektrod és a mikrodialízis kanül, azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy abban az esetben, amikor a PnO-ban és a DpMe-ben is vannak aktív elektrod kontaktusok (azaz párhuzamosan regisztrálunk sejteket), mi történik, ha csak a PnO-ban lévő aktív sejteket paralizáljuk a mikrodialízis segítségével? Ez segítene volna megérteni, hogy hogyan változik meg a DpMe aktivitása, ha a PnO-t regionálisan bénítjuk, és ennek tükrében mi történik a szabadon mozgó állatainkban. Ezen kívül jó

közelítést adott volna a kísérlet arról, hogy mekkora területen fejt ki bénító hatást a TTX, azaz milyen mértékben érintett az általunk célterületnek választott PnO és létrejön-e járulékos hatás a környező területekben. Nyolc olyan sejtet vizsgáltunk meg a PnO-ban, amelyiket mikrodialitikusan próbáltunk reverzibilisen elcsendesíteni TTX-el. Azonban a nyolc esetből ötször a 'probe' behelyezésekor az adott sejt aktivitása megszűnt az elektródon, egyszer pedig megmaradt ugyan az ACSF kontroll alatt, de a mikrodialízis folyamán feltehetőleg megszűnt, ugyanis a TTX dializálás után másnap nem tudtuk az adott eAP alaknak megfelelő tüzelést regisztrálni. Két esetben sikerült reverzibilisen sejtet paralizálni úgy, hogy a kísérlet után másnap is sikeresen tudtunk ugyanazokból a sejtekből elvezetni. Összességében ezek a próbálkozások kudarcnak tekinthetők és felvetik, hogy a vékony drótokkal ellentétben (Ludvig és mtsai., 1994; van Duuren és mtsai., 2007; du Hoffmann és mtsai., 2011) a Si-alapú elektródok nem alkalmasak a mikrodialízissel kombinált kísérletek elvégzésére. Ennek egy lehetséges magyarázata az, hogy a Si-elektródok merevek, így ellentétben a vékony drót elektródokkal, a különböző szöveti elmozdulásokat (pl. a 'probe' behelyezése) nem követik rugalmasan és emiatt a szövet elmozdulásával a regisztrált sejt is eltávolodik az elektród kontaktusok aktív felszínétől.

Az általunk használt 9,4 Teslás Bruker fMRI, összehasonlítva más fMRI-kal, rendkívül jó felbontású képeket adott, de hangsúlyozandó, hogy az fMRI technológia nem alkalmas egy adott struktúra finom belső szerveződésének feltérképezésére. Így a PnO limbikus rendszert és agykérget moduláló hatásait más módszerekkel is meg kell vizsgálni a jövőben, ha azok nagyobb anatómiai, vagy időbeli felbontását és szerveződését akarjuk megérteni. Úgy gondoljuk azonban, hogy az fMRI adatainkból származó FC aktivitás növekedések rendkívül jó kiindulási pontja lesz jövőbeli kísérleteinknek.

A molekuláris neurobiológia fejlődésével a PnO lokális interneuron hálózata ma már transzgén állatokban is vizsgálható (pl.: génkiütött *GAD65/67* egér vagy rekombináns adeno vírus asszociált expresszáltá ún. AVV *GAD-Cre*- vagy *GAD-Cre+* rekombináns egér), amelyet eddig érthetetlen módon nem végzett el a neuroanatómia és a vele kombinált fiziológia *in vivo* és *in vitro* állapotban. A

részben már megemlített óriássejt szelektív optogenetikus stimuláció *ad absurdum* fMRI készülékben is elvégezhető, így az fMRI-BOLD technológiával mért FC aktivitás csak az óriás sejtek aktivációs hatásait mutatná ki. Rendkívül érdekes lenne az fMRI bipoláris aktivációjával általunk nyert FC profilt összehasonlítani az így készült FC képpel.

HIVATKOZÁSOK

- Adamantidis AR, Zhang F, Aravanis AM, Deisseroth K, de Lecea L (2007) Neural substrates of awakening probed with optogenetic control of hypocretin neurons. *Nature* 450:420-424.
- Aertsen AM, Gerstein GL (1985) Evaluation of neuronal connectivity: sensitivity of cross-correlation. *Brain Res* 340:341-354.
- Aertsen AM, Gerstein GL, Habib MK, Palm G (1989) Dynamics of neuronal firing correlation: modulation of "effective connectivity". *J Neurophysiol* 61:900-917.
- Alkire MT (2008) Probing the mind: anesthesia and neuroimaging. *Clin Pharmacol Ther* 84:149-152.
- Alkire MT, Hudetz AG, Tononi G (2008) Consciousness and anesthesia. *Science* 322:876-880.
- Alkire MT, McReynolds JR, Hahn EL, Trivedi AN (2007) Thalamic microinjection of nicotine reverses sevoflurane-induced loss of righting reflex in the rat. *Anesthesiology* 107:264-272.
- Amarasingham A, Harrison MT, Hatsopoulos NG, Geman S (2012) Conditional modeling and the jitter method of spike resampling. *J Neurophysiol* 107:517-531.
- Amatruda TT, 3rd, Black DA, McKenna TM, McCarley RW, Hobson JA (1975) Sleep cycle control and cholinergic mechanisms: differential effects of carbachol injections at pontine brain stem sites. *Brain Res* 98:501-515.
- Anaclet C, Lin JS, Vetrivelan R, Krenzer M, Vong L, Fuller PM, Lu J (2012) Identification and characterization of a sleep-active cell group in the rostral medullary brainstem. *J Neurosci* 32:17970-17976.
- Aschoff J (1967) Human circadian rhythms in activity, body temperature and other functions. *Life Sci Space Res* 5:159-173.
- Aserinsky E, Kleitman N (1953) Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep. *Science* 118:273-274.
- Aston-Jones G, Chen S, Zhu Y, Oshinsky ML (2001) A neural circuit for circadian regulation of arousal. *Nat Neurosci* 4:732-738.
- Aston-Jones G, Ennis M, Pieribone VA, Nickell WT, Shipley MT (1986) The brain nucleus locus coeruleus: restricted afferent control of a broad efferent network. *Science* 234:734-737.
- Baars BJ (1995) Tutorial commentary: surprisingly small subcortical structures are needed for the state of waking consciousness, while cortical projection areas seem to provide perceptual contents of consciousness. *Conscious Cogn* 4:159-162.
- Baars BJ, Ramsoy TZ, Laureys S (2003) Brain, conscious experience and the observing self. *Trends Neurosci* 26:671-675.
- Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA (1984) Site-specific enhancement and suppression of desynchronized sleep signs following cholinergic stimulation of three brainstem regions. *Brain Res* 306:39-52.

- Baghdoyan HA, Rodrigo-Angulo ML, McCarley RW, Hobson JA (1987) A neuroanatomical gradient in the pontine tegmentum for the cholinceptive induction of desynchronized sleep signs. *Brain Res* 414:245-261.
- Baizer JS (2009) Nonphosphorylated neurofilament protein is expressed by scattered neurons in the vestibular and precerebellar brainstem. *Brain Res* 1298:46-56.
- Balaton B, Detari L (2003) EEG related neuronal activity in the pedunclopontine tegmental nucleus of urethane anaesthetized rats. *Brain Res* 959:304-311.
- Baracska P, Szepesi Z, Orban G, Juhasz G, Czurko A (2008) Generalization of seizures parallels the formation of "dark" neurons in the hippocampus and pontine reticular formation after focal-cortical application of 4-aminopyridine (4-AP) in the rat. *Brain Res* 1228:217-228.
- Baracska P, Kiglics V, Kekesi KA, Juhasz G, Czurko A (2009) Status epilepticus affects the gigantocellular network of the pontine reticular formation. *BMC Neurosci* 10:133.
- Bartho P, Hirase H, Monconduit L, Zugaro M, Harris KD, Buzsaki G (2004) Characterization of neocortical principal cells and interneurons by network interactions and extracellular features. *J Neurophysiol* 92:600-608.
- Batini C, Moruzzi G, Palestini M, Rossi GF, Zanchetti A (1958) Persistent patterns of wakefulness in the pretrigeminal midpontine preparation. *Science* 128:30-32.
- Bernard JF, Villanueva L, Carroue J, Le Bars D (1990) Efferent projections from the subnucleus reticularis dorsalis (SRD): a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neurosci Lett* 116:257-262.
- Bester H, Bourgeois L, Villanueva L, Besson JM, Bernard JF (1999) Differential projections to the intralaminar and gustatory thalamus from the parabrachial area: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol* 405:421-449.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Blumenfeld H (2009) Epilepsy and consciousness in the *The Neurology of Consciousness*. Amsterdam: Elsevier.
- Blumenfeld H, Taylor J (2003) Why do seizures cause loss of consciousness? *Neuroscientist* 9:301-310.
- Blumenfeld H, Varghese GI, Purcaro MJ, Motelow JE, Enev M, McNally KA, Levin AR, Hirsch LJ, Tikofsky R, Zubal IG, Paige AL, Spencer SS (2009) Cortical and subcortical networks in human secondarily generalized tonic-clonic seizures. *Brain* 132:999-1012.
- Boehnke SE, Rasmusson DD (2001) Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 105:133-141.
- Boissard R, Fort P, Gervasoni D, Barbagli B, Luppi PH (2003) Localization of the GABAergic and non-GABAergic neurons projecting to the sublaterodorsal

- nucleus and potentially gating paradoxical sleep onset. *Eur J Neurosci* 18:1627-1639.
- Boly M, Garrido MI, Gosseries O, Bruno MA, Boveroux P, Schnakers C, Massimini M, Litvak V, Laureys S, Friston K (2011) Preserved feedforward but impaired top-down processes in the vegetative state. *Science* 332:858-862.
- Bonhomme V, Boveroux P, Brichant JF, Laureys S, Boly M (2012) Neural correlates of consciousness during general anesthesia using functional magnetic resonance imaging (fMRI). *Arch Ital Biol* 150:155-163.
- Bonvallet M, Newman-Taylor A (1967) Neurophysiological evidence for a differential organization of the mesencephalic reticular formation. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 22:54-73.
- Bremer F (1935) Cerveau "isolé" et physiologie du sommeil. *C R Soc Biol* 118 1235–1241.
- Brevig HN, Watson CJ, Lydic R, Baghdoyan HA (2010) Hypocretin and GABA interact in the pontine reticular formation to increase wakefulness. *Sleep* 33:1285-1293.
- Brodal A (1964) Anatomical Points of View on the Alleged Morphological Basis of Consciousness. *Acta Neurochir (Wien)* 12:166-186.
- Brown EN, Lydic R, Schiff ND (2010) General anesthesia, sleep, and coma. *N Engl J Med* 363:2638-2650.
- Brown RE, McKenna JT, Winston S, Basheer R, Yanagawa Y, Thakkar MM, McCarley RW (2008) Characterization of GABAergic neurons in rapid-eye-movement sleep controlling regions of the brainstem reticular formation in GAD67-green fluorescent protein knock-in mice. *Eur J Neurosci* 27:352-363.
- Bruhn J, Kreuer S, Bischoff P, Kessler P, Schmidt GN, Grzesiak A, Wilhelm W (2005) Bispectral index and A-line AAI index as guidance for desflurane-remifentanyl anaesthesia compared with a standard practice group: a multicentre study. *Br J Anaesth* 94:63-69.
- Brunelli G, Spano P, Barlati S, Guarneri B, Barbon A, Bresciani R, Pizzi M (2005) Glutamatergic reinnervation through peripheral nerve graft dictates assembly of glutamatergic synapses at rat skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8752-8757.
- Bruno RL, Cohen JM, Galski T, Frick NM (1994) The neuroanatomy of post-polio fatigue. *Arch Phys Med Rehabil* 75:498-504.
- Bruno RL, Sapolsky R, Zimmerman JR, Frick NM (1995) Pathophysiology of a central cause of post-polio fatigue. *Ann N Y Acad Sci* 753:257-275.
- Buzsaki G, Bickford RG, Ponomareff G, Thal LJ, Mandel R, Gage FH (1988) Nucleus basalis and thalamic control of neocortical activity in the freely moving rat. *J Neurosci* 8:4007-4026.
- Camacho Evangelista A, Reinoso Suarez F (1964) Activating and Synchronizing Centers in Cat Brain: Electroencephalograms after Lesions. *Science* 146:268-270.
- Cavanna AE, Monaco F (2009) Brain mechanisms of altered conscious states during epileptic seizures. *Nat Rev Neurol* 5:267-276.

- Cavanna AE, Mula M, Servo S, Strigaro G, Tota G, Barbagli D, Collimediaglia L, Viana M, Cantello R, Monaco F (2008) Measuring the level and content of consciousness during epileptic seizures: the Ictal Consciousness Inventory. *Epilepsy Behav* 13:184-188.
- Courchesne E, Kilman BA, Galambos R, Lincoln AJ (1984) Autism: processing of novel auditory information assessed by event-related brain potentials. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 59:238-248.
- Covolan L, Mello LE (2006) Assessment of the progressive nature of cell damage in the pilocarpine model of epilepsy. *Braz J Med Biol Res* 39:915-924.
- Covolan L, Ribeiro LT, Longo BM, Mello LE (2000) Cell damage and neurogenesis in the dentate granule cell layer of adult rats after pilocarpine- or kainate-induced status epilepticus. *Hippocampus* 10:169-180.
- Crick F, Koch C (2003) A framework for consciousness. *Nat Neurosci* 6:119-126.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172:143-157.
- Czurko A, Hirase H, Csicsvari J, Buzsaki G (1999) Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *Eur J Neurosci* 11:344-352.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Buzsaki G (1998) Reliability and state dependence of pyramidal cell-interneuron synapses in the hippocampus: an ensemble approach in the behaving rat. *Neuron* 21:179-189.
- Csicsvari J, Hirase H, Czurko A, Mamiya A, Buzsaki G (1999) Oscillatory coupling of hippocampal pyramidal cells and interneurons in the behaving Rat. *J Neurosci* 19:274-287.
- Csordas A, Mazlo M, Gallyas F (2003) Recovery versus death of "dark" (compacted) neurons in non-impaired parenchymal environment: light and electron microscopic observations. *Acta Neuropathol* 106:37-49.
- Datta S, Siwek DF (1997) Excitation of the brain stem pedunculopontine tegmentum cholinergic cells induces wakefulness and REM sleep. *J Neurophysiol* 77:2975-2988.
- Datta S, Siwek DF (2002) Single cell activity patterns of pedunculopontine tegmentum neurons across the sleep-wake cycle in the freely moving rats. *J Neurosci Res* 70:611-621.
- de la Roza C, Reinoso-Suarez F (2006) GABAergic structures in the ventral part of the oral pontine reticular nucleus: An ultrastructural immunogold analysis. *Neuroscience* 142:1183-1193.
- de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327.
- Dehaene S, Changeux JP (2011) Experimental and theoretical approaches to conscious processing. *Neuron* 70:200-227.
- Desmurget M, Sirigu A (2009) A parietal-premotor network for movement intention and motor awareness. *Trends Cogn Sci* 13:411-419.

- Devor M, Zalkind V (2001) Reversible analgesia, atonia, and loss of consciousness on bilateral intracerebral microinjection of pentobarbital. *Pain* 94:101-112.
- Drislane FW (2006) Who's afraid of status epilepticus? *Epilepsia* 47:7-9.
- du Hoffmann J, Kim JJ, Nicola SM (2011) An inexpensive drivable cannulated microelectrode array for simultaneous unit recording and drug infusion in the same brain nucleus of behaving rats. *J Neurophysiol* 106:1054-1064.
- Eccles JC (1957) *The Physiology of Nerve Cells*. Baltimore: Johns Hopkins Press.
- Edelman GM, Gally JA, Baars BJ (2011) Biology of consciousness. *Front Psychol* 2:4.
- Elazar Z, Berchanski A (2000) Excitatory amino acids modulate epileptogenesis in the brain stem. *Neuroreport* 11:1777-1780.
- Endroczi E, Hartmann G, Lissak K (1967) Meso-diencephalic activatory and inhibitory mechanisms: their relations with conditioning, self-stimulation behaviour and control of the pituitary-adrenocortical function. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 31:115-126.
- Englot DJ, Modi B, Mishra AM, DeSalvo M, Hyder F, Blumenfeld H (2009) Cortical deactivation induced by subcortical network dysfunction in limbic seizures. *J Neurosci* 29:13006-13018.
- Englot DJ, Yang L, Hamid H, Danielson N, Bai X, Marfeo A, Yu L, Gordon A, Purcaro MJ, Motelow JE, Agarwal R, Ellens DJ, Golomb JD, Shamy MC, Zhang H, Carlson C, Doyle W, Devinsky O, Vives K, Spencer DD, Spencer SS, Schevon C, Zaveri HP, Blumenfeld H (2010) Impaired consciousness in temporal lobe seizures: role of cortical slow activity. *Brain* 133:3764-3777.
- Ettinger AB, Weisbrot DM, Nolan E, Devinsky O (1999) Postictal symptoms help distinguish patients with epileptic seizures from those with non-epileptic seizures. *Seizure* 8:149-151.
- Faugeras F, Rohaut B, Weiss N, Bekinschtein TA, Galanaud D, Puybasset L, Bolgert F, Sergent C, Cohen L, Dehaene S, Naccache L (2011) Probing consciousness with event-related potentials in the vegetative state. *Neurology* 77:264-268.
- Federico P, Archer JS, Abbott DF, Jackson GD (2005) Cortical/subcortical BOLD changes associated with epileptic discharges: an EEG-fMRI study at 3 T. *Neurology* 64:1125-1130.
- Fee MS, Mitra PP, Kleinfeld D (1996) Automatic sorting of multiple unit neuronal signals in the presence of anisotropic and non-Gaussian variability. *J Neurosci Methods* 69:175-188.
- Fins JJ, Master MG, Gerber LM, Giacino JT (2007) The minimally conscious state: a diagnosis in search of an epidemiology. *Arch Neurol* 64:1400-1405.
- Franks NP (2008) General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9:370-386.
- Franks NP, Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367:607-614.

- Freneau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27:98-103.
- Freneau RT, Jr., Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31:247-260.
- Friston KJ (2011) Functional and effective connectivity: a review. *Brain Connect* 1:13-36.
- Friston KJ, Frith CD, Liddle PF, Frackowiak RS (1993) Functional connectivity: the principal-component analysis of large (PET) data sets. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:5-14.
- Fujisawa S, Buzsaki G (2011) A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. *Neuron* 72:153-165.
- Fujisawa S, Amarasingham A, Harrison MT, Buzsaki G (2008) Behavior-dependent short-term assembly dynamics in the medial prefrontal cortex. *Nat Neurosci* 11:823-833.
- Fuller PM, Saper CB, Lu J (2007) The pontine REM switch: past and present. *J Physiol* 584:735-741.
- Fuller PM, Sherman D, Pedersen NP, Saper CB, Lu J (2011) Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *J Comp Neurol* 519:933-956.
- Galambos R, Despland PA (1980) The auditory brainstem response (ABR) evaluates risk factors for hearing loss in the newborn. *Pediatr Res* 14:159-163.
- Gallyas F, Hsu M, Buzsaki G (1993) Four modified silver methods for thick sections of formaldehyde-fixed mammalian central nervous tissue: 'dark' neurons, perikarya of all neurons, microglial cells and capillaries. *J Neurosci Methods* 50:159-164.
- Gallyas F, Guldner FH, Zoltay G, Wolff JR (1990) Golgi-like demonstration of "dark" neurons with an argyrophil III method for experimental neuropathology. *Acta Neuropathol* 79:620-628.
- Gallyas F, Gasz B, Szigeti A, Mazlo M (2006) Pathological circumstances impair the ability of "dark" neurons to undergo spontaneous recovery. *Brain Res* 1110:211-220.
- Gallyas F, Kiglics V, Baracska P, Juhasz G, Czurko A (2008) The mode of death of epilepsy-induced "dark" neurons is neither necrosis nor apoptosis: an electron-microscopic study. *Brain Res* 1239:207-215.
- Garcia-Rill E, Skinner RD, Miyazato H, Homma Y (2001) Pedunculopontine stimulation induces prolonged activation of pontine reticular neurons. *Neuroscience* 104:455-465.
- Garzon M, De Andres I, Reinoso-Suarez F (1998) Sleep patterns after carbachol delivery in the ventral oral pontine tegmentum of the cat. *Neuroscience* 83:1137-1144.

- Gerber U, Greene RW, McCarley RW (1989) Repetitive firing properties of medial pontine reticular formation neurones of the rat recorded in vitro. *J Physiol* 410:533-560.
- Gerstein GL, Perkel DH (1969) Simultaneously recorded trains of action potentials: analysis and functional interpretation. *Science* 164:828-830.
- Gerstein GL, Aertsen AM (1985) Representation of cooperative firing activity among simultaneously recorded neurons. *J Neurophysiol* 54:1513-1528.
- Giber K, Slezia A, Bokor H, Bodor AL, Ludanyi A, Katona I, Acsady L (2008) Heterogeneous output pathways link the anterior pretectal nucleus with the zona incerta and the thalamus in rat. *J Comp Neurol* 506:122-140.
- Gili T, Saxena N, Diukova A, Murphy K, Hall JE, Wise RG (2013) The thalamus and brainstem act as key hubs in alterations of human brain network connectivity induced by mild propofol sedation. *J Neurosci* 33:4024-4031.
- Gold C, Henze DA, Koch C, Buzsaki G (2006) On the origin of the extracellular action potential waveform: A modeling study. *J Neurophysiol* 95:3113-3128.
- Grastyan E, Lissak K, Kekesi F (1956) Facilitation and inhibition of conditioned alimentary and defensive reflexes by stimulation of the hypothalamus and reticular formation. *Acta Physiol Hung* 9:133-151.
- Grastyan E, Hasznos T, Lissak K, Molnar L, Ruzsonyi Z (1952) Activation of the brain stem activating system by vegetative afferents; a preliminary report. *Acta Physiol Hung* 3:103-122.
- Greene RW, Haas HL, McCarley RW (1986) A low threshold calcium spike mediates firing pattern alterations in pontine reticular neurons. *Science* 234:738-740.
- Handforth A, Treiman DM (1995) Functional mapping of the early stages of status epilepticus: a ^{14}C -2-deoxyglucose study in the lithium-pilocarpine model in rat. *Neuroscience* 64:1057-1073.
- Harris KD, Henze DA, Csicsvari J, Hirase H, Buzsaki G (2000) Accuracy of tetrode spike separation as determined by simultaneous intracellular and extracellular measurements. *J Neurophysiol* 84:401-414.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior*. New York: Wiley.
- Henze DA, Borhegyi Z, Csicsvari J, Mamiya A, Harris KD, Buzsaki G (2000) Intracellular features predicted by extracellular recordings in the hippocampus in vivo. *J Neurophysiol* 84:390-400.
- Hipp JF, Engel AK, Siegel M (2011) Oscillatory synchronization in large-scale cortical networks predicts perception. *Neuron* 69:387-396.
- Hipp JF, Hawellek DJ, Corbetta M, Siegel M, Engel AK (2012) Large-scale cortical correlation structure of spontaneous oscillatory activity. *Nat Neurosci* 15:884-890.
- Hirase H, Leinekugel X, Csicsvari J, Czurko A, Buzsaki G (2001) Behavior-dependent states of the hippocampal network affect functional clustering of neurons. *J Neurosci* 21:RC145.
- Hobson JA, Steriade M (1986) *Handbook of Physiology, The Nervous System, Intrinsic Regulatory Systems of the Brain*
Am Physiol Soc Edition: Bethesda, Wiley.

- Hobson JA, McCarley RW, Wyzinski PW (1975) Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups. *Science* 189:55-58.
- Hobson JA, McCarley RW, Pivik RT, Freedman R (1974a) Selective firing by cat pontine brain stem neurons in desynchronized sleep. *J Neurophysiol* 37:497-511.
- Hobson JA, McCarley RW, Freedman R, Pivik RT (1974b) Time course of discharge rate changes by cat pontine brain stem neurons during sleep cycle. *J Neurophysiol* 37:1297-1309.
- Holmes CJ, Jones BE (1994) Importance of cholinergic, GABAergic, serotonergic and other neurons in the medial medullary reticular formation for sleep-wake states studied by cytotoxic lesions in the cat. *Neuroscience* 62:1179-1200.
- Hudetz AG (2012) General anesthesia and human brain connectivity. *Brain Connect* 2:291-302.
- Hughes SW, Lorincz M, Cope DW, Blethyn KL, Kekesi KA, Parri HR, Juhasz G, Crunelli V (2004) Synchronized oscillations at alpha and theta frequencies in the lateral geniculate nucleus. *Neuron* 42:253-268.
- Ito H, Tsuji S (2000) Model dependence in quantification of spike interdependence by joint peri-stimulus time histogram. *Neural Comput* 12:195-217.
- Ito K, McCarley RW (1984) Alterations in membrane potential and excitability of cat medial pontine reticular formation neurons during changes in naturally occurring sleep-wake states. *Brain Res* 292:169-175.
- Ito K, McCarley RW (1987) Physiological studies of brainstem reticular connectivity. I. Responses of mPRF neurons to stimulation of bulbar reticular formation. *Brain Res* 409:97-110.
- Ito K, Yanagihara M, Imon H, Dauphin L, McCarley RW (2002) Intracellular recordings of pontine medial gigantocellular tegmental field neurons in the naturally sleeping cat: behavioral state-related activity and soma size difference in order of recruitment. *Neuroscience* 114:23-37.
- Jones BE (2003) Arousal systems. *Front Biosci* 8:s438-451.
- Jones BE (2005) From waking to sleeping: neuronal and chemical substrates. *Trends Pharmacol Sci* 26:578-586.
- Joo EY, Tae WS, Hong SB (2006) Regional effects of lamotrigine on cerebral glucose metabolism in idiopathic generalized epilepsy. *Arch Neurol* 63:1282-1286.
- Jouvet M (1969) Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163:32-41.
- Jouvet M, Michel F (1960a) [Demonstration of a "hypnic center" at the level of the rhombencephalon in the cat]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 251:1188-1190.
- Jouvet M, Michel F (1960b) [New research on the structures responsible for the "paradoxical phase" of sleep]. *J Physiol (Paris)* 52:130-131.
- Jouvet M, Michel F (1960c) [Release of the "paradoxal phase" of sleep by stimulation of the brain stem in the intact and chronic mesencephalic cat]. *C R Seances Soc Biol Fil* 154:636-641.

- Jouvet M, Michel F, Courjon J (1959) [Bringing into play of two mechanisms with different electroencephalographic expression during physiological sleep in the cat]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 248:3043-3045.
- Kanai T, Szerb JC (1965) Mesencephalic Reticular Activating System and Cortical Acetylcholine Output. *Nature* 205:80-82.
- Kant I (1781) *A tiszta ész kritikája*. Budapest, 2004: Atlantisz.
- Kaplan PW (2004) The EEG in metabolic encephalopathy and coma. *J Clin Neurophysiol* 21:307-318.
- Kara P, Reid RC (2003) Efficacy of retinal spikes in driving cortical responses. *J Neurosci* 23:8547-8557.
- Kayama Y, Ohta M, Jodo E (1992) Firing of 'possibly' cholinergic neurons in the rat laterodorsal tegmental nucleus during sleep and wakefulness. *Brain Res* 569:210-220.
- Klemm WR (1972a) Ascending and descending excitatory influences in the brain stem reticulum: a re-examination. *Brain Res* 36:444-452.
- Klemm WR (1972b) Effects of electric stimulation of brain stem reticular formation on hippocampal theta rhythm and muscle activity in unanesthetized, cervical- and midbrain-transected rats. *Brain Res* 41:331-344.
- Koch C (2012) Systems biology. Modular biological complexity. *Science* 337:531-532.
- Koch M, Lingenhohl K, Pilz PK (1992) Loss of the acoustic startle response following neurotoxic lesions of the caudal pontine reticular formation: possible role of giant neurons. *Neuroscience* 49:617-625.
- Kohsaka S, Mizukami S, Uetake K, Sakai T, Kohsaka M (1999) Brainstem triggers absence seizures in human generalized epilepsy. *Brain Res* 837:277-288.
- Kohsaka S, Kohsaka M, Mizukami S, Sakai T, Kobayashi K (2001) Brainstem activates paroxysmal discharge in human generalized epilepsy. *Brain Res* 903:53-61.
- Kohsaka S, Mizukami S, Kohsaka M, Shiraishi H, Kobayashi K (2002) Widespread activation of the brainstem preceding the recruiting rhythm in human epilepsies. *Neuroscience* 115:697-706.
- Kovacs GL, Kishonti J, Lissak K, Telegdy G (1976) Inhibitory action of midbrain raphe stimulation on stress-induced elevation of plasma corticosterone level in rats. *Neurosci Lett* 3:305-310.
- Laureys S (2005) The neural correlate of (un)awareness: lessons from the vegetative state. *Trends Cogn Sci* 9:556-559.
- Lee KH, Meador KJ, Park YD, King DW, Murro AM, Pillai JJ, Kaminski RJ (2002) Pathophysiology of altered consciousness during seizures: Subtraction SPECT study. *Neurology* 59:841-846.
- Lee SH, Dan Y (2012) Neuromodulation of brain states. *Neuron* 76:209-222.
- Lee Y, Lopez DE, Meloni EG, Davis M (1996) A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J Neurosci* 16:3775-3789.

- Lenhossék J (1855) Neue Untersuchungen über den feineren Bau des centralen Nervensystems des Menschen I. Medulla spinalis und deren Bulbus rhachiticus. Wien.
- Leumann L, Sterchi D, Vollenweider F, Ludewig K, Fruh H (2001) A neural network approach to the acoustic startle reflex and prepulse inhibition. *Brain Res Bull* 56:101-110.
- Liang CL, Marks GA (2009) A novel GABAergic afferent input to the pontine reticular formation: the mesopontine GABAergic column. *Brain Res* 1297:32-40.
- Lidieth M (2009) sigTOOL: A MATLAB-based environment for sharing laboratory-developed software to analyze biological signals. *J Neurosci Methods* 178:188-196.
- Lin JS, Sakai K, Vanni-Mercier G, Jouvet M (1989) A critical role of the posterior hypothalamus in the mechanisms of wakefulness determined by microinjection of muscimol in freely moving cats. *Brain Res* 479:225-240.
- Lin JS, Hou Y, Sakai K, Jouvet M (1996) Histaminergic descending inputs to the mesopontine tegmentum and their role in the control of cortical activation and wakefulness in the cat. *J Neurosci* 16:1523-1537.
- Lincoln AJ, Courchesne E, Kilman BA, Galambos R (1986) Auditory ERPs and information processing in Down's syndrome children. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 38:492-495.
- Lindsley DB, Bowden JW, Magoun HW (1949) Effect upon the EEG of acute injury to the brain stem activating system. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:475-486.
- Lingenhohl K, Friauf E (1994) Giant neurons in the rat reticular formation: an SEnsorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J Neurosci* 14:1176-1194.
- Liu XP, S ; Baracska, P; Hudetz, AG (2012) Increased Functional Connectivity in the Limbic Network of Isoflurane-Anesthetized Rats During Electrical Stimulation of the Nucleus Pontis Oral. In: ASA 2012 (Pillay SB, P; Hudetz, AG ed).
- Lloyd DP (1946) Facilitation and inhibition of spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 9:421-438.
- Loeb C (1958) Electroencephalographic changes during the state of coma. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10:589-606.
- Lorincz M, Olah M, Baracska P, Szilagyi N, Juhasz G (2007) Propagation of spike and wave activity to the medial prefrontal cortex and dorsal raphe nucleus of WAG/Rij rats. *Physiol Behav* 90:318-324.
- Lu J, Zhou TC, Saper CB (2006a) Identification of wake-active dopaminergic neurons in the ventral periaqueductal gray matter. *J Neurosci* 26:193-202.
- Lu J, Sherman D, Devor M, Saper CB (2006b) A putative flip-flop switch for control of REM sleep. *Nature* 441:589-594.
- Lu J, Bjorkum AA, Xu M, Gaus SE, Shiromani PJ, Saper CB (2002) Selective activation of the extended ventrolateral preoptic nucleus during rapid eye movement sleep. *J Neurosci* 22:4568-4576.

- Lu J, Nelson LE, Franks N, Maze M, Chamberlin NL, Saper CB (2008) Role of endogenous sleep-wake and analgesic systems in anesthesia. *J Comp Neurol* 508:648-662.
- Ludvig N, Potter PE, Fox SE (1994) Simultaneous single-cell recording and microdialysis within the same brain site in freely behaving rats: a novel neurobiological method. *J Neurosci Methods* 55:31-40.
- Luppi PH, Gervasoni D, Verret L, Goutagny R, Peyron C, Salvert D, Leger L, Fort P (2006) Paradoxical (REM) sleep genesis: the switch from an aminergic-cholinergic to a GABAergic-glutamatergic hypothesis. *J Physiol Paris* 100:271-283.
- Lyon R, Feiner J, Lieberman JA (2005) Progressive suppression of motor evoked potentials during general anesthesia: the phenomenon of "anesthetic fade". *J Neurosurg Anesthesiol* 17:13-19.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (1999) Differential c-Fos expression in cholinergic, monoaminergic, and GABAergic cell groups of the pontomesencephalic tegmentum after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 19:3057-3072.
- Maloney KJ, Mainville L, Jones BE (2000) c-Fos expression in GABAergic, serotonergic, and other neurons of the pontomedullary reticular formation and raphe after paradoxical sleep deprivation and recovery. *J Neurosci* 20:4669-4679.
- Manjarrez J, Alvarado R, Camacho-Arroyo I (2001) Differential effects of NMDA antagonists microinjections into the nucleus reticularis pontis caudalis on seizures induced by pentylenetetrazol in the rat. *Epilepsy Res* 46:39-44.
- Marshall L, Henze DA, Hirase H, Leinekugel X, Dragoi G, Buzsaki G (2002) Hippocampal pyramidal cell-interneuron spike transmission is frequency dependent and responsible for place modulation of interneuron discharge. *J Neurosci* 22:RC197.
- Martin EM, Pavlides C, Pfaff D (2010) Multimodal sensory responses of nucleus reticularis gigantocellularis and the responses' relation to cortical and motor activation. *J Neurophysiol* 103:2326-2338.
- Martin EM, Devidze N, Shelley DN, Westberg L, Fontaine C, Pfaff DW (2011) Molecular and neuroanatomical characterization of single neurons in the mouse medullary gigantocellular reticular nucleus. *J Comp Neurol* 519:2574-2593.
- Marton G, Fekete Z, Fiath R, Baracska P, Ulbert I, Juhasz G, Battistig G, Pongracz A (2012a) In vivo measurements with robust silicon-based multielectrode arrays with extreme shaft lengths. *Sensors Journal, IEEE* PP:1-1.
- Marton G, Fekete Z, Bakos I, Battistig G, Pongracz A, Baracska P, Juhasz G, Barsony I (2012b) Deep-brain silicon multielectrodes with surface-modified Pt recording sites. In: *Sensors, 2012 IEEE*, pp 1-4.
- Mashour GA, Alkire MT (2013) Consciousness, anesthesia, and the thalamocortical system. *Anesthesiology* 118:13-15.

- McCarley RW, Hobson JA (1971) Single neuron activity in cat gigantocellular tegmental field: selectivity of discharge in desynchronized sleep. *Science* 174:1250-1252.
- McCarley RW, Ito K, Rodrigo-Angulo ML (1987) Physiological studies of brainstem reticular connectivity. II. Responses of mPRF neurons to stimulation of mesencephalic and contralateral pontine reticular formation. *Brain Res* 409:111-127.
- McGaraughty S, Reinis S (1993) Simultaneous multi- and single-unit recordings in the rostral ventromedial medulla of ketamine-anaesthetized rats, and the cross-correlogram analysis of their interactions. *Exp Brain Res* 92:489-494.
- McIntosh AR, Rajah MN, Lobaugh NJ (2003) Functional connectivity of the medial temporal lobe relates to learning and awareness. *J Neurosci* 23:6520-6528.
- McNaughton N, Sedgwick EM (1978) Reticular stimulation and hippocampal theta rhythm in rats: effects of drugs. *Neuroscience* 3:629-632.
- Medina-Ceja L, Cordero-Romero A, Morales-Villagran A (2008) Antiepileptic effect of carbenoxolone on seizures induced by 4-aminopyridine: a study in the rat hippocampus and entorhinal cortex. *Brain Res* 1187:74-81.
- Mesulam MM, Geula C, Bothwell MA, Hersh LB (1989) Human reticular formation: cholinergic neurons of the pedunculo pontine and laterodorsal tegmental nuclei and some cytochemical comparisons to forebrain cholinergic neurons. *J Comp Neurol* 283:611-633.
- Mhuircheartaigh RN, Rosenorn-Lanng D, Wise R, Jbabdi S, Rogers R, Tracey I (2012) Cortical and subcortical connectivity changes during decreasing levels of consciousness in humans: a functional magnetic resonance imaging study using propofol. *J Neurosci* 30:9095-9102.
- Miller G (2011) Neuroscience. Feedback from frontal cortex may be a signature of consciousness. *Science* 332:779.
- Mitani A, Ito K, Mitani Y, McCarley RW (1988a) Descending projections from the gigantocellular tegmental field in the cat: cells of origin and their brainstem and spinal cord trajectories. *J Comp Neurol* 268:546-566.
- Mitani A, Ito K, Mitani Y, McCarley RW (1988b) Morphological and electrophysiological identification of gigantocellular tegmental field neurons with descending projections in the cat: II. Bulb. *J Comp Neurol* 274:371-386.
- Mitani A, Ito K, Mitani Y, McCarley RW (1988c) Morphological and electrophysiological identification of gigantocellular tegmental field neurons with descending projections in the cat: I. Pons. *J Comp Neurol* 268:527-545.
- Mitani A, Ito K, Hallanger AE, Wainer BH, Kataoka K, McCarley RW (1988d) Cholinergic projections from the laterodorsal and pedunculo pontine tegmental nuclei to the pontine gigantocellular tegmental field in the cat. *Brain Res* 451:397-402.

- Miyazato H, Skinner RD, Cobb M, Andersen B, Garcia-Rill E (1999) Midlatency auditory-evoked potentials in the rat: effects of interventions that modulate arousal. *Brain Res Bull* 48:545-553.
- Monaco F, Mula M, Cavanna AE (2005) Consciousness, epilepsy, and emotional qualia. *Epilepsy Behav* 7:150-160.
- Moore RY, Bloom FE (1979) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci* 2:113-168.
- Moruzzi G, Magoun HW (1949) Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1:455-473.
- Muller CM, Lewandowski MH, Singer W (1993) Structures mediating cholinergic reticular facilitation of cortical responses in the cat: effects of lesions in immunocytochemically characterized projections. *Exp Brain Res* 96:8-18.
- Nadasdy Z, Hirase H, Czurko A, Csicsvari J, Buzsaki G (1999) Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *J Neurosci* 19:9497-9507.
- Nauta WJ (1946) Hypothalamic regulation of sleep in rats; an experimental study. *J Neurophysiol* 9:285-316.
- Nodal FR, Lopez DE (2003) Direct input from cochlear root neurons to pontine reticulospinal neurons in albino rat. *J Comp Neurol* 460:80-93.
- Nunez A, Buno W, Reinoso-Suarez F (1998) Neurotransmitter actions on oral pontine tegmental neurons of the rat: an in vitro study. *Brain Res* 804:144-148.
- Nunez A, Rodrigo-Angulo ML, De Andres I, Reinoso-Suarez F (2002) Firing activity and postsynaptic properties of morphologically identified neurons of ventral oral pontine reticular nucleus. *Neuroscience* 115:1165-1175.
- Nunez A, De la Roza C, Rodrigo-Angulo ML, Buno W, Reinoso-Suarez F (1997) Electrophysiological properties and cholinergic responses of rat ventral oral pontine reticular neurons in vitro. *Brain Res* 754:1-11.
- Oakson G, Steriade M (1982) Slow rhythmic rate fluctuations of cat midbrain reticular neurons in synchronized sleep and waking. *Brain Res* 247:277-288.
- Ogita K, Okuda H, Watanabe M, Nagashima R, Sugiyama C, Yoneda Y (2005) In vivo treatment with the K⁺ channel blocker 4-aminopyridine protects against kainate-induced neuronal cell death through activation of NMDA receptors in murine hippocampus. *Neuropharmacology* 48:810-821.
- Owen AM, Coleman MR (2008) Detecting awareness in the vegetative state. *Ann N Y Acad Sci* 1129:130-138.
- Pare D, Smith Y, Parent A, Steriade M (1988) Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei. *Neuroscience* 25:69-86.
- Parvizi J, Damasio AR (2003a) Differential distribution of calbindin D28k and parvalbumin among functionally distinctive sets of structures in the macaque brainstem. *J Comp Neurol* 462:153-167.
- Parvizi J, Damasio AR (2003b) Neuroanatomical correlates of brainstem coma. *Brain* 126:1524-1536.

- Pavlov IP (1928) Lectures on conditioned reflexes. New York: New York International Publisher.
- Pawela CP, Biswal BB, Hudetz AG, Schulte ML, Li R, Jones SR, Cho YR, Matloub HS, Hyde JS (2009) A protocol for use of medetomidine anesthesia in rats for extended studies using task-induced BOLD contrast and resting-state functional connectivity. *Neuroimage* 46:1137-1147.
- Penfield W (1936) The cerebral cortex in man. I. The cerebral cortex and consciousness *Arch Neurol Psychiat* 40:417-442.
- Penfield W (1952) Epileptic automatisms and the centrencephalic integrating system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 30:513-528.
- Penfield W (1975) *The Mystery of the Mind : A Critical Study of Consciousness and the Human Brain*. New Jersey: Princeton University Press.
- Perrin F, Schnakers C, Schabus M, Degueldre C, Goldman S, Bredart S, Faymonville ME, Lamy M, Moonen G, Luxen A, Maquet P, Laureys S (2006) Brain response to one's own name in vegetative state, minimally conscious state, and locked-in syndrome. *Arch Neurol* 63:562-569.
- Peterson SL (1995) Infusion of NMDA antagonists into the nucleus reticularis pontis oralis inhibits the maximal electroshock seizure response. *Brain Res* 702:101-109.
- Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015.
- Pfaff DW, Martin EM, Faber D (2012) Origins of arousal: roles for medullary reticular neurons. *Trends Neurosci* 35:468-476.
- Pillay S (2013) ANESTHETIC AND ASCENDING AROUSAL SYSTEM MODULATION OF CORTICAL FUNCTIONAL INTEGRATION AND BOLD FUNCTIONAL CONNECTIVITY IN THE RAT BRAIN. In. Milwaukee: Medical College of Wisconsin.
- Pillay S, Vizuite JA, McCallum JB, Hudetz AG (2011) Norepinephrine infusion into nucleus basalis elicits microarousal in desflurane-anesthetized rats. *Anesthesiology* 115:733-742.
- Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113-136.
- Plazzi G, Vetrugno R, Provini F, Montagna P (2005) Sleepwalking and other ambulatory behaviours during sleep. *Neurol Sci* 26 Suppl 3:s193-198.
- Poirier JL, Capek R, De Koninck Y (2000) Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience* 97:59-68.
- Pongrácz A, Fekete Z, Márton G, Bérces Z, Ulbert I, Fürjes P (2013) Deep-brain silicon multielectrodes for simultaneous in vivo neural recording and drug delivery. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2013
- Porrino LJ, Goldman-Rakic PS (1982) Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP. *J Comp Neurol* 205:63-76.

- Posner MI, Rothbart MK, Sheese BE, Tang Y (2007) The anterior cingulate gyrus and the mechanism of self-regulation. *Cogn Affect Behav Neurosci* 7:391-395.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294.
- Raisinghani M, Faingold CL (2005) Pontine reticular formation neurons are implicated in the neuronal network for generalized clonic seizures which is intensified by audiogenic kindling. *Brain Res* 1064:90-97.
- Raizada RD, Poldrack RA (2007) Challenge-driven attention: interacting frontal and brainstem systems. *Front Hum Neurosci* 1:3.
- Rasmusson DD, Clow K, Szerb JC (1994) Modification of neocortical acetylcholine release and electroencephalogram desynchronization due to brainstem stimulation by drugs applied to the basal forebrain. *Neuroscience* 60:665-677.
- Rees G, Kreiman G, Koch C (2002) Neural correlates of consciousness in humans. *Nat Rev Neurosci* 3:261-270.
- Riehle A, Grun S, Diesmann M, Aertsen A (1997) Spike synchronization and rate modulation differentially involved in motor cortical function. *Science* 278:1950-1953.
- Rodrigo-Angulo ML, Rodriguez-Veiga E, Reinoso-Suarez F (2005) A quantitative study of the brainstem cholinergic projections to the ventral part of the oral pontine reticular nucleus (REM sleep induction site) in the cat. *Exp Brain Res* 160:334-343.
- Rosanova M, Gosseries O, Casarotto S, Boly M, Casali AG, Bruno MA, Mariotti M, Boveroux P, Tononi G, Laureys S, Massimini M (2012) Recovery of cortical effective connectivity and recovery of consciousness in vegetative patients. *Brain* 135:1308-1320.
- Royce GJ, Bromley S, Gracco C (1991) Subcortical projections to the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 306:129-155.
- Saper CB (2006) Staying awake for dinner: hypothalamic integration of sleep, feeding, and circadian rhythms. *Prog Brain Res* 153:243-252.
- Saper CB, Chou TC, Scammell TE (2001) The sleep switch: hypothalamic control of sleep and wakefulness. *Trends Neurosci* 24:726-731.
- Saper CB, Fuller PM, Pedersen NP, Lu J, Scammell TE (2010) Sleep state switching. *Neuron* 68:1023-1042.
- Sara SJ (2009) The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10:211-223.
- Sastre JP, Buda C, Kitahama K, Jouvet M (1996) Importance of the ventrolateral region of the periaqueductal gray and adjacent tegmentum in the control of paradoxical sleep as studied by muscimol microinjections in the cat. *Neuroscience* 74:415-426.
- Scheibel M, Scheibel A, Mollica A, Moruzzi G (1955) Convergence and interaction of afferent impulses on single units of reticular formation. *J Neurophysiol* 18:309-331.

- Scheibel ME, Scheibel AB (1958) Reticular Formation of the Brain. Boston: Little Brown.
- Scheibel ME, Scheibel AB (1960) Brain and behavior: session I. symposium, 1959. 2. The physiology of consciousness. *Am J Orthopsychiatry* 30:10-14.
- Schenck CH, Pareja JA, Patterson AL, Mahowald MW (1998) Analysis of polysomnographic events surrounding 252 slow-wave sleep arousals in thirty-eight adults with injurious sleepwalking and sleep terrors. *J Clin Neurophysiol* 15:159-166.
- Schiff ND, Fins JJ (2007) Deep brain stimulation and cognition: moving from animal to patient. *Curr Opin Neurol* 20:638-642.
- Schlick M (1910) Das Wesen der Wahrheit nach der modernen Logik, in: *Vierteljahrsschrift für wissenschaftliche Philosophie und Soziologie*.
- Schnakers C, Perrin F, Schabus M, Hustinx R, Majerus S, Moonen G, Boly M, Vanhaudenhuyse A, Bruno MA, Laureys S (2009) Detecting consciousness in a total locked-in syndrome: an active event-related paradigm. *Neurocase* 15:271-277.
- Schneider G, Hollweck R, Ningler M, Stockmanns G, Kochs EF (2005) Detection of consciousness by electroencephalogram and auditory evoked potentials. *Anesthesiology* 103:934-943.
- Semba K, Reiner PB, McGeer EG, Fibiger HC (1988) Brainstem afferents to the magnocellular basal forebrain studied by axonal transport, immunohistochemistry, and electrophysiology in the rat. *J Comp Neurol* 267:433-453.
- Serafin M, Vidal PP, Muhlethaler M (1996) Electrophysiological study of nucleus gigantocellularis neurons in guinea-pig brainstem slices. *Neuroscience* 73:797-805.
- Shaw NA (1991) A possible thalamic component of the auditory evoked potential in the rat. *Brain Res Bull* 27:133-136.
- Shehab S, Alzigali L, Madathil M, Redgrave P (2007) Pharmacological evidence for an anticonvulsant relay in the rat ventromedial medulla. *Eur J Neurosci* 26:2585-2594.
- Shehab S, McGonigle D, Hughes DI, Todd AJ, Redgrave P (2005) Anatomical evidence for an anticonvulsant relay in the rat ventromedial medulla. *Eur J Neurosci* 22:1431-1444.
- Sherin JE, Shiromani PJ, McCarley RW, Saper CB (1996) Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science* 271:216-219.
- Sherrington C (1906) The integrative action of the nervous system. New Haven: Yale University Press.
- Shiromani PJ, McGinty DJ (1986) Pontine neuronal response to local cholinergic infusion: relation to REM sleep. *Brain Res* 386:20-31.
- Siegel JM, McGinty DJ, Breedlove SM (1977) Sleep and waking activity of pontine gigantocellular field neurons. *Exp Neurol* 56:553-573.
- Silberman EK, Vivaldi E, Garfield J, McCarley RW, Hobson JA (1980) Carbachol triggering of desynchronized sleep phenomena: enhancement via small volume infusions. *Brain Res* 191:215-224.

- Simons-Weidenmaier NS, Weber M, Plappert CF, Pilz PK, Schmid S (2006) Synaptic depression and short-term habituation are located in the sensory part of the mammalian startle pathway. *BMC Neurosci* 7:38.
- Sirota A, Csicsvari J, Buhl D, Buzsaki G (2003) Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2065-2069.
- Staunton H (2008) Arousal by stimulation of deep-brain nuclei. *Nature* 452:E1; discussion E1-2.
- Steriade M (1993) Central core modulation of spontaneous oscillations and sensory transmission in thalamocortical systems. *Curr Opin Neurobiol* 3:619-625.
- Steriade M, Hobson J (1976) Neuronal activity during the sleep-waking cycle. *Prog Neurobiol* 6:155-376.
- Steriade M, Deschenes M (1984) The thalamus as a neuronal oscillator. *Brain Res* 320:1-63.
- Steriade M, McCarley RW (1990) Brainstem control of wakefulness and sleep: Plenum Press.
- Steriade M, Oakson G, Ropert N (1982) Firing rates and patterns of midbrain reticular neurons during steady and transitional states of the sleep-waking cycle. *Exp Brain Res* 46:37-51.
- Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262:679-685.
- Steriade M, Pare D, Parent A, Smith Y (1988) Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey. *Neuroscience* 25:47-67.
- Sukhotinsky I, Hopkins DA, Lu J, Saper CB, Devor M (2005) Movement suppression during anesthesia: neural projections from the mesopontine tegmentum to areas involved in motor control. *J Comp Neurol* 489:425-448.
- Sukhotinsky I, Zalkind V, Lu J, Hopkins DA, Saper CB, Devor M (2007) Neural pathways associated with loss of consciousness caused by intracerebral microinjection of GABA A-active anesthetics. *Eur J Neurosci* 25:1417-1436.
- Supp GG, Siegel M, Hipp JF, Engel AK (2011) Cortical hypersynchrony predicts breakdown of sensory processing during loss of consciousness. *Curr Biol* 21:1988-1993.
- Szabo-Salfay O, Palhalmi J, Szatmari E, Barabas P, Szilagyi N, Juhasz G (2001) The electroretinogram and visual evoked potential of freely moving rats. *Brain Res Bull* 56:7-14.
- Szerb JC (1967) Cortical acetylcholine release and electroencephalographic arousal. *J Physiol* 192:329-343.
- Szymusiak R, Alam N, Steininger TL, McGinty D (1998) Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res* 803:178-188.
- Tae WS, Joo EY, Han SJ, Lee KH, Hong SB (2007) CBF changes in drug naive juvenile myoclonic epilepsy patients. *J Neurol* 254:1073-1080.

- Tigyi A, Miriszlai E, Kiss K, Lissak K (1960) Significance of vagal afferentation in the regulation of diencephalic vegetative reactions. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 17:401-406.
- Tononi G (2004) An information integration theory of consciousness. *BMC Neurosci* 5:42.
- Tononi G (2008) Consciousness as integrated information: a provisional manifesto. *Biol Bull* 215:216-242.
- Tononi G, Edelman GM (1998) Consciousness and complexity. *Science* 282:1846-1851.
- Tononi G, Koch C (2008) The neural correlates of consciousness: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1124:239-261.
- Treiman DM (1995) Electroclinical features of status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 12:343-362.
- Treiman DM, Walton NY, Kendrick C (1990) A progressive sequence of electroencephalographic changes during generalized convulsive status epilepticus. *Epilepsy Res* 5:49-60.
- Tsubokawa T, Yamamoto T, Katayama Y, Hirayama T, Maejima S, Moriya T (1990) Deep-brain stimulation in a persistent vegetative state: follow-up results and criteria for selection of candidates. *Brain Inj* 4:315-327.
- Usrey WM, Reppas JB, Reid RC (1998) Paired-spike interactions and synaptic efficacy of retinal inputs to the thalamus. *Nature* 395:384-387.
- Valverde F (1961a) A new type of cell in the lateral reticular formation of the brain stem. *J Comp Neurol* 117:189-195.
- Valverde F (1961b) Reticular formation of the pons and medulla oblongata. A Golgi study. *J Comp Neurol* 116:71-99.
- Valverde F (1962) Reticular formation of the albino rat's brain stem cytoarchitecture and corticofugal connections. *J Comp Neurol* 119:25-53.
- Van Bockstaele EJ, Aston-Jones G (1992) Collateralized projections from neurons in the rostral medulla to the nucleus locus coeruleus, the nucleus of the solitary tract and the periaqueductal gray. *Neuroscience* 49:653-668.
- van den Pol AN, Gallyas F (1990) Trauma-induced Golgi-like staining of neurons: a new approach to neuronal organization and response to injury. *J Comp Neurol* 296:654-673.
- van Duuren E, van der Plasse G, van der Blom R, Joosten RN, Mulder AB, Pennartz CM, Feenstra MG (2007) Pharmacological manipulation of neuronal ensemble activity by reverse microdialysis in freely moving rats: a comparative study of the effects of tetrodotoxin, lidocaine, and muscimol. *J Pharmacol Exp Ther* 323:61-69.
- Vanhaudenhuyse A, Laureys S, Perrin F (2008) Cognitive event-related potentials in comatose and post-comatose states. *Neurocrit Care* 8:262-270.
- Varga V, Losonczy A, Zemelman BV, Borhegyi Z, Nyiri G, Domonkos A, Hangya B, Holderith N, Magee JC, Freund TF (2009) Fast synaptic subcortical control of hippocampal circuits. *Science* 326:449-453.

- Ventura V, Cai C, Kass RE (2005a) Trial-to-trial variability and its effect on time-varying dependency between two neurons. *J Neurophysiol* 94:2928-2939.
- Ventura V, Cai C, Kass RE (2005b) Statistical assessment of time-varying dependency between two neurons. *J Neurophysiol* 94:2940-2947.
- Vertes RP (1977) Selective firing of rat pontine gigantocellular neurons during movement and REM sleep. *Brain Res* 128:146-152.
- Vertes RP (1979) Brain stem gigantocellular neurons: patterns of activity during behavior and sleep in the freely moving rat. *J Neurophysiol* 42:214-228.
- Vertes RP (1982) Brain stem generation of the hippocampal EEG. *Prog Neurobiol* 19:159-186.
- Vertes RP, Miller NE (1976) Brain stem neurons that fire selectively to a conditioned stimulus for shock. *Brain Res* 103:229-242.
- Vertes RP, Kocsis B (1997) Brainstem-diencephalo-septohippocampal systems controlling the theta rhythm of the hippocampus. *Neuroscience* 81:893-926.
- Villanueva L, Desbois C, Le Bars D, Bernard JF (1998) Organization of diencephalic projections from the medullary subnucleus reticularis dorsalis and the adjacent cuneate nucleus: a retrograde and anterograde tracer study in the rat. *J Comp Neurol* 390:133-160.
- Vizuete JA, Pillay S, Diba K, Ropella KM, Hudetz AG (2012) Monosynaptic functional connectivity in cerebral cortex during wakefulness and under graded levels of anesthesia. *Front Integr Neurosci* 6:90.
- von Economo C (1930) Sleep as a problem of localization. In: *J. Nerv. Ment. Dis.*, pp 249–259. New York: College of Physicians and Surgeons, Columbia University.
- von Kölliker A (1867) *Handbuch der Gewebelehre des Menschen* Leipzig: Engelmann.
- Watanabe H, Fukatsu H, Katsuno M, Sugiura M, Hamada K, Okada Y, Hirayama M, Ishigaki T, Sobue G (2004) Multiple regional ¹H-MR spectroscopy in multiple system atrophy: NAA/Cr reduction in pontine base as a valuable diagnostic marker. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:103-109.
- Watson CJ, Lydic R, Baghdoyan HA (2011) Sleep duration varies as a function of glutamate and GABA in rat pontine reticular formation. *J Neurochem* 118:571-580.
- Watson CJ, Soto-Calderon H, Lydic R, Baghdoyan HA (2008) Pontine reticular formation (PnO) administration of hypocretin-1 increases PnO GABA levels and wakefulness. *Sleep* 31:453-464.
- Weber M, Schnitzler HU, Schmid S (2002) Synaptic plasticity in the acoustic startle pathway: the neuronal basis for short-term habituation? *Eur J Neurosci* 16:1325-1332.
- Webster HH, Jones BE (1988) Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat. II. Effects upon sleep-waking states. *Brain Res* 458:285-302.
- Winters WD (1976) Effects of drugs on the electrical activity of the brain: anesthetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 16:413-426.

- Winters WD, Mori K, Spooner CE, Kado RT (1967a) Correlation of reticular and cochlear multiple unit activity with auditory evoked responses during wakefulness and sleep. I. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 23:539-545.
- Winters WD, Mori K, Spooner CE, Bauer RO (1967b) The neurophysiology of anesthesia. Anesthesiology 28:65-80.
- Woolf NJ, Butcher LL (1989) Cholinergic systems in the rat brain: IV. Descending projections of the pontomesencephalic tegmentum. Brain Res Bull 23:519-540.
- Xi MC, Morales FR, Chase MH (1999a) A GABAergic pontine reticular system is involved in the control of wakefulness and sleep. Sleep Res Online 2:43-48.
- Xi MC, Morales FR, Chase MH (1999b) Evidence that wakefulness and REM sleep are controlled by a GABAergic pontine mechanism. J Neurophysiol 82:2015-2019.
- Xi MC, Morales FR, Chase MH (2004) Interactions between GABAergic and cholinergic processes in the nucleus pontis oralis: neuronal mechanisms controlling active (rapid eye movement) sleep and wakefulness. J Neurosci 24:10670-10678.
- Yamamoto K, Mamelak AN, Quattrochi JJ, Hobson JA (1990a) A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: locus of the sensitive region. Neuroscience 39:279-293.
- Yamamoto K, Mamelak AN, Quattrochi JJ, Hobson JA (1990b) A cholinceptive desynchronized sleep induction zone in the anterodorsal pontine tegmentum: spontaneous and drug-induced neuronal activity. Neuroscience 39:295-304.
- Yamamoto T, Katayama Y, Kobayashi K, Oshima H, Fukaya C, Tsubokawa T (2010) Deep brain stimulation for the treatment of vegetative state. Eur J Neurosci 32:1145-1151.
- Ypparila H, Nunes S, Korhonen I, Partanen J, Ruokonen E (2004) The effect of interruption to propofol sedation on auditory event-related potentials and electroencephalogram in intensive care patients. Crit Care 8:R483-490.

ÖSSZEFOGLALÁS

A Nucleus Reticularis Pontis Oralis (PnO) a felszálló aktiváló rendszer (Ascending Reticular Activating System, ARAS) egyik kulcsszereplője. Az ARAS-nak fontos szerepe van az agykéreg függő tudatos állapot fenntartásában és kialakításában, azáltal, hogy képes összeszervezni a különböző agykérgi régiók információ integráló kapacitását. Az ARAS sérülése tudatvesztést és kómát okozhat.

A *status epilepticus* (SE) végső fázisában az ARAS klasszikus magjaiban levő óriás sejtes hálózat szenved szelektív sérülést. Az óriás sejteket akkor érte hisztopatológiailag kimutatható sérülés, amikor állataink az SE következtében elvesztették tudatukat. Hipotézisünk szerint az SE kései fázisában kialakuló kómát, melyhez lassú hullámú EEG és atonia társult, az ARAS óriás sejtjeinek funkcionális hanyatlása okozza úgy, hogy képtelenek tovább közvetíteni a szenzoros információ aktiváló hatását az agykéreg felé. Érdekelt minket, hogy a PnO óriás sejtjeinek működése *arousal* függő-e szabadon mozgó állapotban. Ennek érdekében egy Si-elektrod/flexibilis PCB kábel/mikromozgató rendszert fejlesztettünk ki, amely segítségével hatékonyan tudtunk extracelluláris akciós potenciálokat elvezetni az agytörzsből viselkedő állatokból. Kimutattuk, hogy a PNO óriás sejtjei *arousal* függőek és körülöttük egy kiterjedt interneuron hálózat helyezkedik el, mely erős szinaptikus kapcsolatban áll az óriás sejtekkel.

Megvizsgáltuk, hogy a PnO magas frekvenciás ingerlése által kialakult EEG deszinkronizációhoz mely területek között társult a funkcionális konnektivitás (FC) megnövekedése. A PnO stimulációjának hatására a frontális, anterior cingularis és retrosplenialis kérgék között nőtt meg az FC mértéke fMRI-BOLD képalkotásban. Mivel ezeknek a kérgeknek a funkcionális kapcsolata a tudatos állapot esszenciális feltétele, úgy gondoljuk, hogy a PnO aktiváló hatása fontos a tudatos állapot fenntartásában azáltal, hogy képes az említett kérgi régiók információ integráló képességét összeszervezni.

SUMMARY

The nucleus reticularis pontis oralis (PnO) is a key region of ascending reticular activating system (ARAS). The ARAS plays a pivotal role in establishing, maintaining and modulating cortical and behavioral *arousal*, and disruption to this system can lead to unconsciousness.

The impairment of giant cell network of the pontine reticular formation has been revealed to be histopathologically connected with *status epilepticus* (SE) induced unconsciousness. According to our hypothesis in later phase of SE occurring slow EEG activity we could regard as the electrophysiological consequence of the affected, dysfunctional giant neurons in the *reticular formation* because they are incapable of mediating the arousal influence toward the cerebral cortex.

Our aim was to register extracellular action potentials from the ARAS nuclei concurrently. We constructed a Si-based electrode/flexible PCB cable/microdrive system that is suitable for measuring multiple single unit neural activity simultaneously from several deep ARAS nuclei. We proved that the giant neurons in the PnO are *arousal* related and there are the PnO widespread interneuronal network.

We investigated whether electrical stimulation of the PnO would facilitate electroencephalographic *arousal* and alter functional connectivity (FC) in the fMRI-BOLD signal during light isoflurane anesthesia.

Electrical stimulation of the PnO was also accompanied by an increase in BOLD-FC between the nucleus basalis of Meynert and key regions of the medial paralimbic system that may allow for affective and episodic information processing between the cortex and related subcortical networks.

This research demonstrates that the PnO influences are able to enhance cortical dependent processing of sensory information.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni elsősorban témavezetőimnek **Czurkó Andrásnak** és Juhász Gábornak, hogy nemcsak szakmai, hanem baráti támogatást is nyújtottak a munkám során. Személyes segítségük nélkül a munka nem jöhetett volna létre.

Külön köszönet illeti **Anthony Hudetz** professzort, akinek laboratóriumában vendégkutatóként dolgozhattam és ahol az fMRI vizsgálatok elkészültek. Az fMRI képalkotásban nyújtott segítségükért köszönet jár **Siveshigan Pillay-nak**, **Matt Runquist-nak** és **Xiping Liu-nak**. **Shi-Jiang Li-nek** a MCW képalkotó központjának igazgatójának is jár a köszönet, mivel rendelkezésünkre bocsátotta a kisállat MRI-t, mert végig támogatta és türelemmel viselte a kísérleteket, még akkor is ha engedélye nélkül fúrtam át laboratóriuma falait.

Márton Gergely, **Pongrácz Anita** és **Fekete Zoltán** a Si-elektrod megvalósítását végezték el. **Plósz Béla** mikrotechnikus a mikromozgató legyártását végezte el nagyszerűen. Nélkülük nem lehetett volna egysejtaktivitásokat regisztrálni az agytörzsből.

Szeretném megköszönni **Cseri Barbarának**, **Kiglics Violának**, **Boros Mariannának** és **Kékesi Katalinnak** a kísérletekben és a kézirat javításában vállalt segítségüket. Rajtuk kívül köszönet jár a Proteomikai Laboratórium **összes munkatársának** is a baráti és emberi légkörért.

Szüleimnek elsősorban a neveltetésem szeretném megköszönni, másodsorban a türelmüket és támogatásukat, mely nélkül soha nem lehettem volna „doktorandusz”.

Feleségem nemcsak a mindennapokban, hanem a dolgozat írásában is sokat segített.